

Les *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines dans les toxi-infections d'origine alimentaire

CHAHED A., CHINA B., DAUBE G.

Université de Liège, Faculté de Médecine vétérinaire, Département des Sciences des Denrées alimentaires, Laboratoire de Microbiologie, Boulevard de Colonster, 20, bâtiment B43B, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Prof. Georges DAUBE Tél : +32(0)4/366 40 15- Fax : +32(0)4/366 40 44 Email : georges.daube@ulg.ac.be

RESUME : Certains *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) sont responsables de toxi-infections d'origine alimentaire qui se traduisent par des diarrhées mais aussi par des syndromes plus graves pour l'homme comme le syndrome hémolytique urémique pouvant provoquer la mort. Il s'agit d'agents zoonotiques dont le réservoir principal est le bovin et les autres ruminants. Les principaux modes de transmission des infections à STEC à l'homme sont la consommation d'aliments contaminés (viande de boeuf peu cuite, produits laitiers non pasteurisés), la transmission de personne à personne, l'ingestion d'eau contaminée et le contact avec des animaux (notamment les bovins) et leur environnement.

Les facteurs de virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines sont principalement les protéines codées par un îlot de pathogénicité, « *Locus of Enterocyte Effacement* », impliquées dans la formation de la lésion d'attachement et d'effacement et de la diarrhée et les toxines de Shiga codées par des bactériophages et impliquées dans les syndromes extra-intestinaux. La souche de STEC du sérotype O157:H7 est responsable d'épidémies dans le monde causant des milliers de malades et des dizaines de morts. De nombreuses méthodes de diagnostic ont été développées pour identifier ce pathogène à partir des aliments. Elles regroupent des méthodes de bactériologie classique, des méthodes immunologiques et des méthodes moléculaires. Des mesures d'hygiène sont particulièrement importantes pour éviter la contamination des animaux à la ferme et celle de la viande à l'abattoir. Enfin, des modèles d'évaluation du risque ont été développés notamment afin de modéliser le comportement des STEC dans l'aliment.

1. PREAMBULE ET EXPOSE DES MOTIFS

Depuis les années '80, les *Escherichia coli* (*E. coli*) du sérotype O157:H7 ont été responsables de nombreuses épidémies de toxi-infections d'origine alimentaire dans le monde entier causant des milliers de malades et des dizaines de morts. Ce

phénomène est d'autant plus remarquable qu'il touche principalement les jeunes enfants. C'est pourquoi, un intérêt tout particulier a été porté à ce germe pathogène. Cette synthèse vise à expliquer les origines, les propriétés et les dangers liés aux souches pathogènes d'*E. coli* O157:H7 entéro-hémorragiques ainsi qu'aux souches virulentes apparentées.

2. DEFINITIONS ET NOMENCLATURE

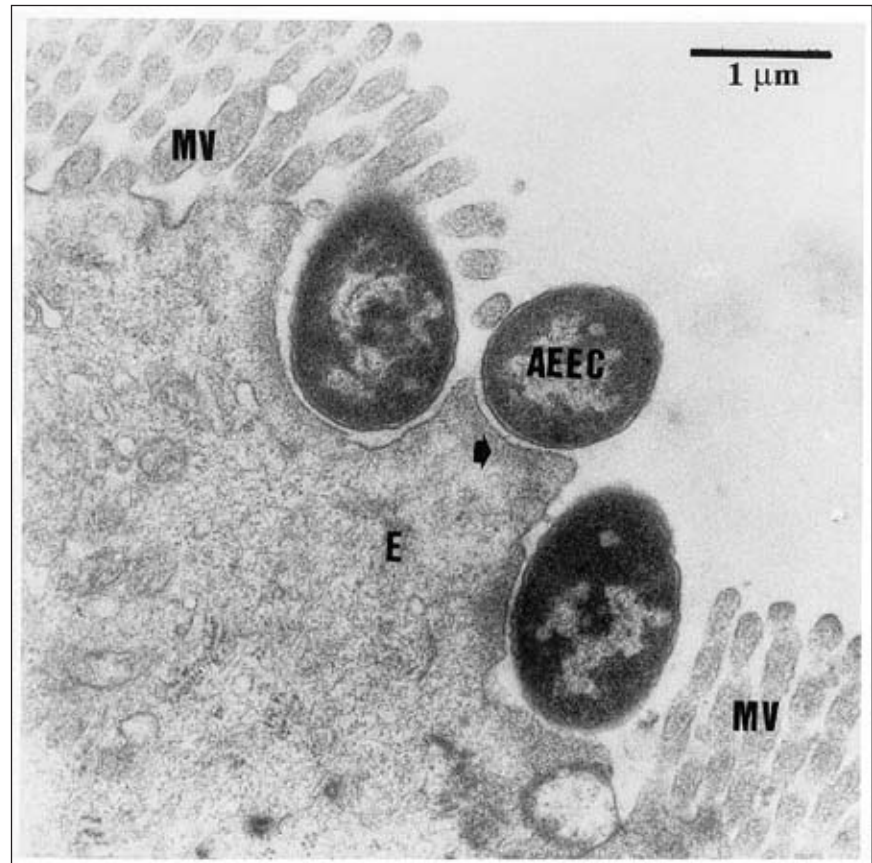
Pour commencer, il est important de pouvoir bien se situer par rapport à la nomenclature quelque peu rébarbative qui concerne les *E. coli* responsables de toxi-infections d'origine alimentaire (Mainil et Daube, 2005).

Parmi les *E. coli* pathogènes, on distingue notamment les *E. coli* attachantes et effaçantes (AEEC pour « *Attaching and effacing E. coli* ») se caractérisant par un attachement intime des bactéries aux entérocytes suivi d'un effacement des microvillosités (Moon *et al.*, 1983) (figure 1). Il s'agit d'une définition liée à la lésion anatomopathologique produite.

Les AEEC regroupent les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), responsables de diarrhées chez l'homme et les animaux, et les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), responsables de diarrhées, de dysenteries et de pathologies extra-intestinales comme le syndrome hémolytique urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) chez l'homme. Les souches similaires trouvées chez les animaux où seuls les symptômes entériques peuvent exister sont appelées EHEC-like. Les souches EHEC en plus de produire la lésion d'attachement et d'effacement (AE) produisent des toxines dont l'archétype est la toxine Stx (*Shigatoxin*) de *Shigella dysenteriae* qui comprend aussi des souches non AEEC. Les EHEC font donc partie aussi de la famille des STEC ou *Shigatoxin-producing E. coli*. L'acronyme EHEC est basé sur une caractéristique clinique alors que STEC est une définition phénotypique, voire génotypique, selon la méthode de caractérisation utilisée. Par conséquent, si la souche est isolée d'un aliment, on parlera de STEC alors que si elle est isolée d'un patient, on parlera plutôt d'EHEC. Les STEC sont aussi appelés VTEC, pour « *verotoxin-producing E. coli* », car les toxines Stx sont toxiques pour les cellules Vero en culture. Pour rappel, le terme VTEC (*Verotoxigenic Escherichia coli*) est utilisé par les autorités européennes (European Food Safety Authority, EFSA) alors que le terme STEC (autrefois SLTEC pour *Shiga-like toxin producing E. coli* (Karmali, 1989)) est utilisé par les autorités américaines (Center for Disease Control and Prevention, CDC) (Mainil et Daube, 2005).

Pour être complet, il faut aussi signaler que les toxines Stx, autrefois Slt pour « *Shiga-like toxins* », sont aussi appelées VT pour « *Verotoxins* ». Notons enfin que les *E. coli* O157:H7 responsables d'épidémies font partie des EHEC produisant les lésions d'attachement et d'effacement (Moon *et al.*, 1983) et des toxines de type Stx.

Figure 1 : La lésion d'attachement et d'effacement (microscopie électronique) (China, 2000)



Les *E. coli* attachantes et effaçantes (AEEC) s'attachent intimement à l'entérocyte et effacent les microvillosités (MV) conduisant à l'accumulation d'actine et à la formation du piédestal (flèche) (China, 2000).

Il faut cependant indiquer que d'autres sérotypes d'EHEC sont aussi impliqués dans des pathologies semblables à celles qui sont provoquées par les EHEC O157:H7. Citons notamment les sérotypes : O26, O91, O103, O111, O118, O128 et O145 (Mainil et Daube, 2005). Mais la plupart de ces souches sont associées à des cas sporadiques plutôt qu'à de réelles épidémies.

3. PATHOLOGIES HUMAINES ET ANIMALES LIÉES AUX *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE SHIGATOXINES (STEC)

E. coli est un hôte normal de la flore intestinale des mammifères et des oiseaux. Les STEC sont portés principalement par les bovins mais aussi par les ovins, les oiseaux et dans une moindre mesure les porcs (Caprioli *et al.*, 2005).

Chez l'homme, après ingestion d'une dose infectieuse faible (inférieure à 100 unités formant colonies) (Caprioli, 2005) et après une incubation de 3 à 4 jours pouvant aller jusqu'à 10 jours (Karmali, 1989), les infections à STEC peuvent revêtir des tableaux cliniques variés allant de la diarrhée bénigne à des colites hémorragiques (Caprioli, 2005). Ces dernières se compliquent parfois au bout de quelques jours d'un syndrome hémolytique urémique (SHU) chez l'enfant et le sujet âgé et plus rarement de purpura thrombotique et thrombocytopénique (PTT) chez l'adulte (Griffin et Tauxe, 1991).

SHU et PTT ont en commun des lésions des cellules endothéliales de la microcirculation suivies d'un gonflement cellulaire, d'aggrégation plaquettaire et de thrombose. Les manifestations sont déterminées par le lit vasculaire le plus atteint : celui des reins pour le SHU, celui du système nerveux pour les PTT. Ces deux affections sont caractérisées par une microangiopathie sévère et une réduction marquée du

taux de plaquettes et du taux d'hémoglobine (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003).

Chez les animaux, les STEC sont responsables de diarrhées et de dysenterie chez le jeune veau (China *et al.*, 1998). L'absence de récepteurs pour les toxines Stx expliquerait que les ruminants ne développent pas de toxémie ou de dommage vasculaire systémique (Pruimboom-Brees *et al.*, 2000).

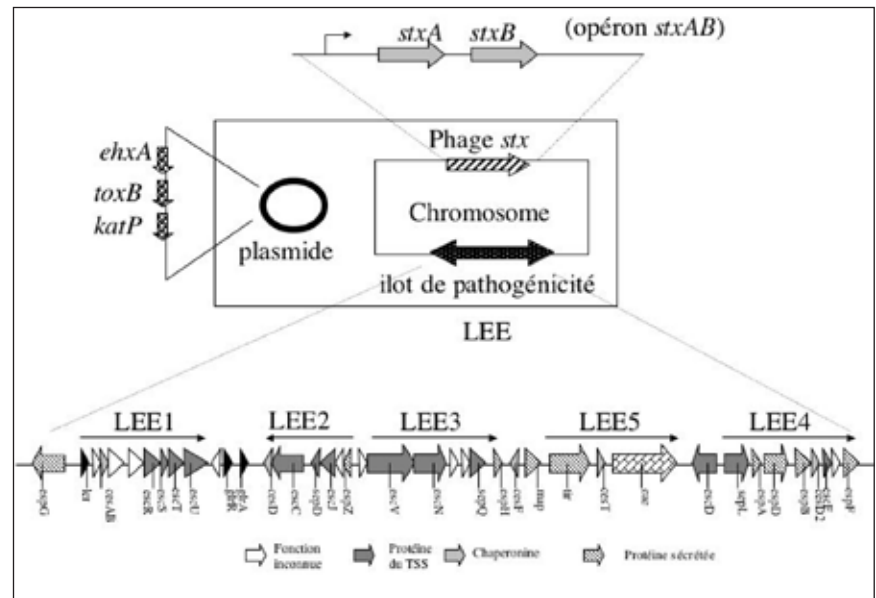
Des STEC non AEEC sont également responsables de la maladie de l'œdème chez le porc. Les animaux atteints présentent des signes nerveux, ont des œdèmes en particulier des paupières, du larynx et du front. Ils titubent, semblent aveugles et, dans les cas les plus avancés, sont couchés sur le côté et présentent des mouvements de pédalage. La mort peut survenir dans les 24 heures après le début des signes cliniques (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003). La toxine Stx2e, un variant porcin des toxines Stx, est responsable des dommages vasculaires, des œdèmes ainsi que des foyers de dégénérescence dans le tronc cérébral (angiopathie cérébrospinale) des porcs atteints. Les sérotypes les plus fréquemment impliqués sont les sérotypes O138, O139 et O141 (Heuvelink *et al.*, 1999).

Malgré la sensibilité à de nombreuses classes d'antibiotiques de la majorité des souches de *E. coli* O157:H7, l'utilisation d'antibiotiques comme traitement chez l'homme, est encore controversée. L'utilisation des antibiotiques comme traitement pourrait conduire à l'aggravation de l'infection par destruction de la bactérie, induisant des concentrations en toxines libres plus élevées et, de ce fait, plus disponibles à l'absorption systémique augmentant le risque de survenue du SHU (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003).

Des essais de traitement ciblant les toxines ont été réalisés grâce à un composant du récepteur pour bloquer les toxines Stx1 et Stx2 libres dans l'intestin, ce qui réduirait leur absorption.

Le traitement serait alors administré très tôt dès l'apparition de la maladie. D'autres voies thérapeutiques comme l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-Stx ont également été testées (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003).

Figure 2 : Schéma des principaux éléments génétiques responsables de la virulence des *E. coli* producteurs de Shigatoxines.



Sur le chromosome, on trouve principalement, l'îlot de pathogénicité LEE comprend 40 grilles ouvertes de lectures (flèches) et 5 unités de transcription (LEE1 à LEE5). Les gènes du LEE codent pour l'intimine (gène eae), des protéines sécrétées par le TTSS ou des chaperonines. Le LEE est impliqué dans la formation de la lésion d'attachement et d'effacement. Des bactériophages intégrés dans le chromosome bactérien portent les opérons stxAB qui codent pour les Shigatoxines. À côté du chromosome on trouve un plasmide de haut poids moléculaire qui porte des gènes codant pour des facteurs potentiellement impliqués dans la virulence comme les gènes ehxA codant pour l'entérohémolysine, le gène toxB codant une adhésine et le gène katP codant pour une catalase-peroxydase.

4. FACTEURS DE VIRULENCE DES SOUCHES *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRAGIQUES (EHEC)

La virulence d'une bactérie est une mesure quantitative de son pouvoir pathogène. Les gènes de virulence codent pour des propriétés qui sont impliquées dans le processus de pathogénie.

Les gènes qui codent pour les principaux facteurs de virulence des STEC sont portés par des éléments mobiles du génome, éléments acquis lors d'échanges génétiques par transfert horizontal : îlots de pathogénicité, bactériophages et plasmides (figure 2).

4.1. Les Shigatoxines

Certaines souches d'*E. coli* produisent une cytotoxine qui est létale pour les cellules Vero ou HeLa en culture, entérotoxique au niveau de l'anse intestinale de lapins et létale pour la souris. Cette toxine proche de la toxine Shiga de *Shigella dysenteriae* a été désignée *Shiga like toxin* (Slt) et rebaptisée par la suite, Shigatoxine (Stx).

Ultérieurement, plusieurs études permirent de distinguer deux types antigéniques de toxines. Les deux types de toxines ont été initialement dénommés Slt-I et Slt-II et ultérieurement Stx1 et Stx2. Des variants de ces toxines ont été très vite identifiés de telle manière que les toxines Stx1 et Stx2 constituent des familles de toxines (Mainil, 1999).

4.1.1. Génétique et structure des Shigatoxines

Ces toxines sont des holoprotéines de 70 kDa constituées d'une sous-unité A (possédant l'activité enzymatique) de 33 kDa et de 5 sous-unités B (pour binding ou liaison au récepteur) de 7,7 kDa chacune (Donohue-Rolfé et Keusch, 1983).

D'un point de vue génétique, la sous-unité A est codée par le gène stxA et la sous-unité B par le gène stxB. Ces deux gènes forment un opéron porté par des phages lysogènes spécifiques de type lambda (Scotland *et al.*, 1983) à l'exception de la production de la toxine Stx2e. Ainsi, l'opéron stx1 code pour la toxine Stx1 et l'opéron stx2 code pour la toxine Stx2.

4.1.2. Mécanismes d'action des Shigatoxines

Au niveau de la cellule eucaryote, les sous-unités B de la toxine Stx, assemblées en anneau, se lient à un récepteur glycolipidique, le globotriosyl céramide (Gb3) (galactose- α (1-4), galactose-(1-4) glucosyl-céramide) (Mainil, 1999). Une fois la toxine internalisée par un mécanisme classique d'endocytose, elle subit un transport rétrograde à travers l'appareil de Golgi, puis le réticulum endoplasmique. La sous-unité A est alors scindée en deux parties A1 et A2 par réduction d'un pont di-sulfure. La partie A1 ainsi activée est transloquée dans le cytoplasme où elle exerce son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S bloquant la sous unité 60S du ribosome et l'arrêt de la synthèse protéique et la mort cellulaire (effet apoptotique). En outre, la toxine (la sous-unité B, en particulier) induirait la production de cytokines par les cellules intestinales. Elles activent la réponse inflammatoire et le développement des lésions au niveau de la barrière intestinale favorisant ainsi la dissémination systémique des toxines au niveau de l'organisme.

Les différents aspects de la pathologie liée à la production des toxines Stx par les STEC peuvent être reproduits chez de nombreuses espèces animales. Les différentes études ont confirmé le rôle des toxines Stx dans la pathologie des STEC et ont permis de développer le concept que les lésions tissulaires observées étaient liées au niveau d'expression des récepteurs glycolipidiques des toxines au niveau de ces tissus.

4.1.3. Les variants des toxines Stx

Les toxines Stx1

Elles représentent un groupe homogène et sont neutralisées par les anticorps dirigés contre la toxine de *S. dysenteriae* avec laquelle elles présentent 99 % d'homologie (figure 3). Récemment, quelques variants du gène *stx1* ont été décrits : *stx1*, *stx1c* et *stx1d*.

Le variant *stx1* correspond à la séquence nucléotidique du gène *stx1* porté par le phage 933J de la souche de référence EDL 933 (Strockbine *et al.*, 1986) et représente le variant de référence ou variant « sauvage ».

Le variant *stx1c*, tout d'abord mis en évidence chez des souches d'origine

ovine et nommé *stx1OX3* (Paton *et al.*, 1995), a été retrouvé plus tardivement, chez des souches humaines et fut rebaptisé *stx1c* (Zhang *et al.*, 2002a). Chez l'homme, il est associé à des cas de diarrhées sans complication, ou bien n'entraîne aucun symptôme. Les pourcentages d'identité avec le gène *stx1* sont respectivement de 97 et 95 % pour les séquences des gènes *stxA* et *stxB*. Les protéines, quant à elles, ne diffèrent que de 9 et 3 acides aminés correspondant à 97,1 et 96,6 % d'homologie entre les sous-unités A et B respectivement. Koch et collaborateurs (2001) ont montré que l'opéron *stx1c* est fréquemment détecté dans les sérotypes O146:H21 et O128:H2 isolés chez les ovins et chez l'homme. Les ovins seraient probablement à l'origine de la transmission de ces germes à l'homme chez qui ils seraient responsables d'une forme bénigne de maladie (Burk *et al.*, 2003).

Le variant *stx1d* (Burk *et al.*, 2003) a été mis en évidence chez une souche d'origine bovine. Un séquençage des gènes a montré que les régions codant les sous-unités A et B possédait 93 et 92 % d'identité respectivement avec la séquence de référence *stx1*. Ce résultat correspond à une différence de 20 acides aminés pour la sous-unité A et de 7 acides aminés pour la sous-unité B. Les sites d'actions des deux sous-unités sont fortement conservés. Très peu d'informations sur la toxicité de ce variant sont disponibles.

Les toxines Stx2

Elles constituent un groupe hétérogène, bien distinct de Stx1 et ne présentent que 56 % d'homologie avec la toxine Stx de *S. dysenteriae* type 1 (Strockbine *et al.*, 1986). Les souches productrices de Stx2 sont plus virulentes et ont été très souvent associées aux formes graves d'infections (SHU et TTP) (Ostroff *et al.*, 1989). Le variant *stx2* est l'opéron « sauvage » correspondant aux gènes de la souche de référence EDL 933 qui porte le phage 933W (Strockbine *et al.*, 1986). Les variants *stx2* sont nombreux. Au moins 7 variants ont été identifiés à ce jour : *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*, et *stx2NV206* (Friedrich *et al.*, 2002 ; Leung *et al.*, 2003). Les variants ont tout d'abord été mis en évidence sur la base de différences de leur activité biologique, de réactivité sérologique, ou de spécificité de liaison aux récepteurs des toxines Stx (Calderwood *et al.*, 1996). Ces diffé-

rences sont majoritairement dues à des mutations au niveau de la séquence nucléotidique des gènes *stx* modifiant donc légèrement la structure primaire de la toxine (Piérard *et al.*, 1998).

Les régions les plus conservées des toxines correspondent aux acides aminés impliqués dans le site enzymatique de la sous-unité A ou dans la liaison au récepteur Gb3 de la sous-unité B (Jackson *et al.*, 1990). Les caractéristiques phénotypiques des souches possédant des variants expliquent pourquoi certaines souches sont associées à des hôtes spécifiques. Le caractère dangereux pour l'homme n'en est pas pour autant toujours absent, puisque par exemple des cas de diarrhées dus à une souche possédant le variant *stx2e*, ont été décrits (Piérard *et al.*, 1991).

Le premier variant décrit fut celui des STEC impliqués dans la maladie de l'œdème du porc. La toxine Stx2e diffère de Stx2 au niveau de la sous-unité A par un acide aminé en plus que Stx2 (94 % d'homologie) et deux acides aminés en moins pour la sous-unité B (79 % d'homologie) (Weinstein *et al.*, 1988).

La protéine codée par le variant *stx2e* possède globalement la même structure que toutes les autres Shigatoxines, mais elle diffère de celles-ci par sa fixation préférentielle au récepteur Gb4 au lieu de Gb3 (Gannon *et al.*, 1990 ; Ito *et al.*, 1990). Les souches possédant ce variant sont donc peu pathogènes pour l'homme (qui possède le récepteur Gb3 sur ses cellules) et sont impliquées dans la maladie de l'œdème du porc (espèce possédant à la surface de ses cellules le récepteur Gb4).

Un deuxième variant (Stx2c) est de plus grande importance clinique et biologique chez l'homme. La toxine Stx2c diffère de la toxine Stx2 au niveau de la sous-unité B. Le groupe de variants Stx2c comporte deux sous-variants : Stx2vh-a et Stx2vh-b. Ils ont été mis en évidence dans une même souche d'EHEC O91:H21 isolée d'un patient atteint d'un SHU (Ito *et al.*, 1990). Le gène *stx2vh-a* présente respectivement 98,6 % et 95,5 % d'identité avec les régions de *stx2* codant les sous-unités A et B. L'opéron *stx2vh-b* présente 99 % d'identité avec *stx2vh-a* sur la totalité de la séquence d'ADN (figure 3).

Figure 3 : les variants des toxines Stx

| | | |
|-----------------------------------|--|-----|
| A | | |
| Stx _{1A} ₀₁₅₇ | MKIIIFRVLTFFVFVFSVNVVAKFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGID | 80 |
| Stx _{1A} | MKIIIFRVLTFFVFVFSVNVVAKFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGID | 80 |
| Stx _{1c} A | MKIIIFRVLTFFVFVFSVNVVAKFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDNLFAVDVRGID | 80 |
| Stx _{1d} A | MKIIIFRVLTFFVFVFSVNVVAKFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDNLFAVDVRGID | 80 |
| Stx _{1A} ₀₁₅₇ | PEEGRFNNLRLLIVERNNLYVTGFVNRTNNVYRFADFHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSITTS | 160 |
| Stx _{1A} | PEEGRFNNLRLLIVERNNLYVTGFVNRTNNVYRFADFHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSITTS | 160 |
| Stx _{1c} A | PEEGRFNNLRLLIVERNNLYVTGFVNRTNNVYRFADFHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSITTS | 160 |
| Stx _{1d} A | PEEGRFNNLRLLIVERNNLYVTGFVNRTNNVYRFADFHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSITTS | 160 |
| Stx _{1A} ₀₁₅₇ | YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAELRFRQIQRGFRFTLLDDLSGRSYVMTAEDVDLTNLWGRLLSSVLPDYHGQDS | 240 |
| Stx _{1A} | YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAELRFRQIQRGFRFTLLDDLSGRSYVMTAEDVDLTNLWGRLLSSVLPDYHGQDS | 240 |
| Stx _{1c} A | YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAELRFRQIQRGFRFTLLDDLSGRSYVMTAEDVDLTNLWGRLLSSVLPDYHGQDS | 240 |
| Stx _{1d} A | YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAELRFRQIQRGFRFTLLDDLSGRSYVMTAEDVDLTNLWGRLLSSVLPDYHGQDS | 240 |
| Stx _{1A} ₀₁₅₇ | VRVGRISFGSINAILGVALILNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVGRITHNKLWDSSTLGAILMRRITTS | 315 |
| Stx _{1A} | VRVGRISFGSINAILGVALILNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVGRITHNKLWDSSTLGAILMRRITTS | 315 |
| Stx _{1c} A | VRVGRISFGSINAILGVALILNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVGRITHNKLWDSSTLGAILMRRITTS | 315 |
| Stx _{1d} A | VRVGRISFGSINAILGVALILNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVGRITHNKLWDSSTLGAILMRRITTS | 315 |
| B | | |
| StxB | MKKTLIAASLSFFSASALATPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNQLSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGRSEVIFR | 89 |
| Stx _{1B} | MKKTLITASLSFFSASALATPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNQLSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGRSEVIFR | 89 |
| Stx _{1c} B | MKKTLIAASLSFFSASALATPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNQLSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGRSEVIFR | 89 |
| Stx _{1d} B | MKKTLIAASLSFFSASALATPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNQLSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGRSEVIFR | 89 |
| C | | |
| Stx _{2A} ₀₁₅₇ | MKCILFKWVLCLLGFSSVSYSREFTIDFSTQSSVSSLSIRTEISTPLEHISQGTTSVSVINHTPPGSYFAVDIRGLD | 80 |
| Stx _{2c} A | MKCILFKWVLCLLGFSSVSYSREFTIDFSTQSSVSSLSIRTEISTPLEHISQGTTSVSVINHTPPGSYFAVDIRGLD | 80 |
| Stx _{2NV206A} | MKCILFKWVLCLLGFSSVSYSREFTIDFSTQSSVSSLSIRTEISTPLEHISQGTTSVSVINHTPPGSYFAVDIRGLD | 80 |
| Stx _{2doutA} | MKCILFKWVLCLLGFSSVSYSREFTIDFSTQSSVSSLSIRTEISTPLEHISQGTTSVSVINHTPPGSYFAVDIRGLD | 80 |
| Stx _{2dout3A} | MKCILFKWVLCLLGFSSVSYSREFTIDFSTQSSVSSLSIRTEISTPLEHISQGTTSVSVINHTPPGSYFAVDIRGLD | 80 |
| Stx _{2g} A | MKCILFKWVLCLLGFSSVSYSREFTIDFSTQSSVSSLSIRTEISTPLEHISQGTTSVSVINHTPPGSYFAVDIRGLD | 80 |
| Stx _{2e} A | MKCILFKWVLCLLGFSSVSYSREFTIDFSTQSSVSSLSIRTEISTPLEHISQGTTSVSVINHTPPGSYFAVDIRGLD | 80 |
| Stx _{2f} A | MKCILFKWVLCLLGFSSVSYSREFTIDFSTQSSVSSLSIRTEISTPLEHISQGTTSVSVINHTPPGSYFAVDIRGLD | 80 |
| Stx _{2A} | MKCILFKWVLCLLGFSSVSYSREFTIDFSTQSSVSSLSIRTEISTPLEHISQGTTSVSVINHTPPGSYFAVDIRGLD | 80 |
| Stx _{2A} ₀₁₅₇ | VYQARFDHLRLIEQNLLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHSVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAAALERSGMQISRHSVLSS | 160 |
| Stx _{2c} A | VYQARFDHLRLIEQNLLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHSVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAAALERSGMQISRHSVLSS | 160 |
| Stx _{2NV206A} | VYQARFDHLRLIEQNLLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHSVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAAALERSGMQISRHSVLSS | 160 |
| Stx _{2doutA} | VYQARFDHLRLIEQNLLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHSVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAAALERSGMQISRHSVLSS | 160 |
| Stx _{2dout3A} | VYQARFDHLRLIEQNLLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHSVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAAALERSGMQISRHSVLSS | 160 |
| Stx _{2g} A | VYQARFDHLRLIEQNLLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHSVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAAALERSGMQISRHSVLSS | 160 |
| Stx _{2e} A | VYQARFDHLRLIEQNLLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHSVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAAALERSGMQISRHSVLSS | 160 |
| Stx _{2f} A | VYQARFDHLRLIEQNLLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHSVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAAALERSGMQISRHSVLSS | 160 |
| Stx _{2A} | VYQARFDHLRLIEQNLLYVAGFVNTATNTFYRFSDFTHSVPGVTTVSMTTDSSYTTLQRVAAALERSGMQISRHSVLSS | 160 |
| Stx _{2A} ₀₁₅₇ | YLALMEFSGNTMTDASRAVLRFVTVTAELRFRQIQREFRQALSETAP-VYTMTPGDVDLTNLWGRISNVLPEYRGEDG | 240 |
| Stx _{2c} A | YLALMEFSGNTMTDASRAVLRFVTVTAELRFRQIQREFRQALSETAP-VYTMTPGDVDLTNLWGRISNVLPEYRGEDG | 240 |
| Stx _{2NV206A} | YLALMEFSGNTMTDASRAVLRFVTVTAELRFRQIQREFRQALSETAP-VYTMTPGDVDLTNLWGRISNVLPEYRGEDG | 240 |
| Stx _{2doutA} | YLALMEFSGNTMTDASRAVLRFVTVTAELRFRQIQREFRQALSETAP-VYTMTPGDVDLTNLWGRISNVLPEYRGEDG | 240 |
| Stx _{2dout3A} | YLALMEFSGNTMTDASRAVLRFVTVTAELRFRQIQREFRQALSETAP-VYTMTPGDVDLTNLWGRISNVLPEYRGEDG | 240 |
| Stx _{2g} A | YLALMEFSGNTMTDASRAVLRFVTVTAELRFRQIQREFRQALSETAP-VYTMTPGDVDLTNLWGRISNVLPEYRGEDG | 240 |
| Stx _{2e} A | YLALMEFSGNTMTDASRAVLRFVTVTAELRFRQIQREFRQALSETAP-VYTMTPGDVDLTNLWGRISNVLPEYRGEDG | 240 |
| Stx _{2f} A | YLALMEFSGNTMTDASRAVLRFVTVTAELRFRQIQREFRQALSETAP-VYTMTPGDVDLTNLWGRISNVLPEYRGEDG | 240 |
| Stx _{2A} | YLALMEFSGNTMTDASRAVLRFVTVTAELRFRQIQREFRQALSETAP-VYTMTPGDVDLTNLWGRISNVLPEYRGEDG | 240 |
| Stx _{2A} ₀₁₅₇ | VRVGRISFNNISAILGTAVILNCHHOGARSVRVAVNEESQPECQITGDRPVKINNTLWESNTAAAFNRKRSQFLYTTGK | 319 |
| Stx _{2c} A | VRVGRISFNNISAILGTAVILNCHHOGARSVRVAVNEESQPECQITGDRPVKINNTLWESNTAAAFNRKRSQFLYTTGK | 319 |
| Stx _{2NV206A} | VRVGRISFNNISAILGTAVILNCHHOGARSVRVAVNEESQPECQITGDRPVKINNTLWESNTAAAFNRKRSQFLYTTGK | 319 |
| Stx _{2doutA} | VRVGRISFNNISAILGTAVILNCHHOGARSVRVAVNEESQPECQITGDRPVKINNTLWESNTAAAFNRKRSQFLYTTGK | 319 |
| Stx _{2dout3A} | VRVGRISFNNISAILGTAVILNCHHOGARSVRVAVNEESQPECQITGDRPVKINNTLWESNTAAAFNRKRSQFLYTTGK | 319 |
| Stx _{2g} A | VRVGRISFNNISAILGTAVILNCHHOGARSVRVAVNEESQPECQITGDRPVKINNTLWESNTAAAFNRKRSQFLYTTGK | 319 |
| Stx _{2e} A | VRVGRISFNNISAILGTAVILNCHHOGARSVRVAVNEESQPECQITGDRPVKINNTLWESNTAAAFNRKRSQFLYTTGK | 319 |
| Stx _{2f} A | VRVGRISFNNISAILGTAVILNCHHOGARSVRVAVNEESQPECQITGDRPVKINNTLWESNTAAAFNRKRSQFLYTTGK | 319 |
| Stx _{2A} | VRVGRISFNNISAILGTAVILNCHHOGARSVRVAVNEESQPECQITGDRPVKINNTLWESNTAAAFNRKRSQFLYTTGK | 319 |
| D | | |
| Stx _{2c} B | MKK-MFMAVLFAFASVNAAMAA-DCAKGKIEFSKYNNEDTFTVKVGKEYWTSRWNQLPQLLSAQLTGMTVTIKSSTCESGSGFAEVQFD | 89 |
| Stx _{2NV206B} | MKK-MFMAVLFAFASVNAAMAA-DCAKGKIEFSKYNNEDTFTVKVGKEYWTSRWNQLPQLLSAQLTGMTVTIKSSTCESGSGFAEVQFND | 89 |
| Stx _{2B} | MKK-MFMAVLFAFASVNAAMAA-DCAKGKIEFSKYNNEDTFTVKVGKEYWTSRWNQLPQLLSAQLTGMTVTIKSSTCESGSGFAEVQFND | 89 |
| Stx _{2g} B | MKK-MFMAVLFAFASVNAAMAA-DCAKGKIEFSKYNNEDTFTVKVGKEYWTSRWNQLPQLLSAQLTGMTVTIKSSTCESGSGFAEVQFND | 89 |
| Stx _{2d} B | MKK-MFMAVLFAFASVNAAMAA-DCAKGKIEFSKYNNEDTFTVKVGKEYWTSRWNQLPQLLSAQLTGMTVTIKSSTCESGSGFAEVQFND | 70 |
| Stx _{2dout3B} | MKK-MFMAVLFAFASVNAAMAA-DCAKGKIEFSKYNNEDTFTVKVGKEYWTSRWNQLPQLLSAQLTGMTVTIKSSTCESGSGFAEVQFN | 87 |
| Stx _{2f} B | MKK-MFMAVLFAFASVNAAMAA-DCAKGKIEFSKYNNEDTFTVKVGKEYWTSRWNQLPQLLSAQLTGMTVTIKSSTCESGSGFAEVQFN | 87 |
| StxB | MKKTLIAASLSFFSASALATPDCVTGKVEYTKYNDDDTFTVKVGDKELFTNRWNQLSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGRSEVIFR | 89 |

Les séquences protéiques des sous-unités A et B des toxines Stx1 et Stx2 ont été alignées. Les nombres entre parenthèses correspondent au numéro d'accès des séquences dans la banque de séquences Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A. Sous-unités A de la toxine Stx1. Stx_{1A}₀₁₅₇ (AAD04656), Stx_{1A} de *Shigella dysenteriae* (CAC05622), stx_{1c}A (CAA85370), stx_{1d}A (AA019475)

B. Sous-unités B de la toxine Stx1. StxB de *Shigella dysenteriae* (I410186), stx_{1B} (CAA8537), stx_{1c}B (BAC78640), stx_{1d}B (AA019476)

C. Sous-unités A de la toxine Stx2. Stx_{2A}₀₁₅₇ (CAA71747), stx_{2A} (AAS07596), stx_{2NV206A} (AAK66972), stx_{2doutA} (AAG23694), stx_{2g}A (AAS07612), stx_{2e}A (CAD99416), stx_{2f}A (CAC05560), stx_{2A} (CAC05622), stx_{2dout3A} (AA46767)

D. Sous-unités B de la toxine Stx2. stx_{2B} (AAS07581), stx_{2NV206B} (AAS07607), stx_{2B} (AAS07607), stx_{2g}B (AAG23695), stx_{2dout3B} (CAA46768), stx_{2e}B (CAA57178), stx_{2f}B (CAC05571), stxB *S. dysenteriae* (I410186B). Les acides aminés différents sont surlignés en noir.

Le groupe de variant *stx2d* est constitué des sous-groupes *stx2d-Ount*, *stx2d-OX3a* et *stx2d-O111*. Ils ont été mis en évidence dans des souches humaines ou animales (Koch *et al.*, 2001).

Les toxines Stx2d semblent moins pathogènes chez l'homme puisqu'elles sont le plus souvent associées à des souches isolées d'humains n'ayant pas développé de pathologies graves (Friedrich *et al.*, 2002). Le gène codant pour la sous-unité A de ces variants présente environ 95 % d'identité avec *stx2* contre 88 % seulement pour le gène *stx2B*. Les opérons *stx2d-Ount*, *stx2d-OX3a* et *stx2d-O111* présentent entre 96,6 et 99,9 % d'identité entre eux (Piérard *et al.*, 1998) (figure 3).

Le variant *stx2f* présente 70,6 % et 98 % d'identité respectivement avec les parties codant les sous-unités A et B du gène *stx2e* (figure 3). Cependant, de récentes études ont montré que les souches possédant l'opéron *stx2f* ne sont retrouvées que dans des fèces de pigeons (Morabito *et al.*, 2001). Ces animaux représenteraient donc le réservoir naturel de ces souches, mais il est encore difficile d'évaluer le danger lié à celles-ci pour l'homme. Une étude regroupant une importante collection de STEC a montré que le variant *stx2f* n'avait été retrouvé dans aucune des 626 souches étudiées, suggérant que les souches possédant *stx2f* ne sont que faiblement pathogènes pour l'homme (Friedrich *et al.*, 2002). Des études plus approfondies seraient donc nécessaires pour évaluer clairement ce risque.

Le variant *stx2g*, mis en évidence dans une souche d'origine bovine, présente des pourcentages d'identité compris entre 63 et 94,9 % avec les gènes précédemment décrits (figure 3). La comparaison des séquences des opérons *stx2g* et *stx2* montre que la région la plus conservée correspond à celle codant la partie centrale de la sous-unité A (Leung *et al.*, 2003). La faible prévalence des souches possédant ce variant suggère qu'il s'agit certainement de souches émergentes encore peu répandues dans les élevages. Cependant, une forte homologie de séquence en acides aminés avec les toxines produites par des souches associées à des maladies humaines et une conservation des sites actifs de la protéine confèrent aux sou-

ches produisant la toxine Stx2g un caractère potentiellement pathogène pour l'homme (Leung *et al.*, 2003). D'autres études doivent être menées afin d'apprécier plus finement la virulence associée à ce variant.

La séquence nucléotidique de l'opéron du variant *stx2NV206*, mis en évidence dans une souche d'origine bovine, a été comparée à celles des opérons connus et montre 94,5 à 99 % d'identité au niveau du gène *stx2A* et 81,5 à 96 % d'identité avec *stx2B*. Les séquences protéiques présentent, quant à elles, respectivement 94 à 99 % et 87 à 98 % d'homologie pour les sous-unités A et B (Bertin *et al.*, 2001) (figure 3). À ce jour, aucune étude concernant la fréquence d'identification ou le pouvoir pathogène de ce variant n'a été menée.

Tous les variants ont les mêmes particularités génétiques que les gènes de référence, *stx1* et *stx2*. Il n'est donc pas rare, suite à l'insertion de plusieurs phages dans le chromosome bactérien, d'observer des souches possédant plusieurs variants. Les souches STEC peuvent produire une seule toxine (Stx1 ou Stx2), ou les deux Stx1 et Stx2 (souche EDL 933) ou encore deux toxines Stx2 différentes (Karmali, 1989).

4.1.4. Association à la symptomatologie

Les toxines Stx et leurs variants n'ont pas la même importance au niveau clinique. Les souches STEC productrices de la toxine Stx2 et Stx2c sont responsables des formes graves (diarrhée hémorragique, syndrome hémolytique urémique, PTT) des infections à STEC chez l'homme et appartiennent le plus souvent au sérotype O157. La toxine Stx2 est mille fois plus puissante que Stx1. De même, parmi les variants *stx2*, *stx2* est plus virulent que *stx2* et *stx2c* ou *stx2c* seul.

Le variant *stx2d* (*stx2d* encode les toxines Stx2d-Ount et Stx2d-OX3) a été impliqué dans des formes bénignes (diarrhée sans complication) ou asymptomatiques (Friedrich *et al.*, 2002). Enfin, les souches STEC O157:H7 présentant le profil O157:H7:PT2:*stx2:stx2c:eae:ehly* sont considérées comme étant les plus virulentes (Eklund *et al.*, 2002).

Le développement et la mise au point des méthodes de détection des gènes de virulence des STEC et du typage

des variants *stx* présentent un grand intérêt dans le sens où leur caractérisation apporte des renseignements sur l'évolution, le degré de sévérité de l'infection, sur la source de contamination et permet d'évaluer le risque d'apparition du SHU lié à STEC.

4.2. La lésion d'attachement-effacement

4.2.1. Génétique

La lésion d'attachement et d'effacement a été décrite pour la première fois en 1983 (Moon *et al.*, 1983). Elle se caractérise par un attachement intime de la bactérie à l'entérocyte suivi d'un effacement des microvillosités et d'une accumulation d'actine dans l'entérocyte au point d'attachement de la bactérie. Il en résulte une image caractéristique en piédestal (figure 1).

Le criblage d'une banque de mutants a permis de mettre en évidence *in vitro* les gènes impliqués dans ce phénomène (Donnenberg *et al.*, 1989). Le premier gène identifié fut le gène *eae* pour « *E. coli attaching effacing* ». Il code pour une protéine de membrane externe de 94 à 97 kDa (selon les souches) appelée l'intimine pour son implication dans l'attachement intime de la bactérie aux cellules épithéliales (Jerse *et al.*, 1990). Les mutants dans ce gène ne montrent pas de lésion d'attachement et d'effacement que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Jerse *et al.*, 1990). Des études de mutagenèse par transposition ont permis de décrire d'autres gènes impliqués dans ce phénomène.

Tous ces gènes sont regroupés au sein d'un îlot de pathogénicité appelé LEE pour « *Locus of Enterocyte Effacement* » (McDaniel *et al.*, 1995). Un îlot de pathogénicité est un ensemble de gènes regroupés en un endroit précis du génome et qui sont impliqués dans la pathogénicité de la bactérie.

Le LEE est long de 35 à 43 kb selon les souches, il est présent chez toutes les souches AEEC regroupant aussi bien des EPEC que des EHEC (McDaniel *et al.*, 1995 ; Goffaux *et al.*, 1999) mais aussi chez *Citrobacter rodentium* (Deng *et al.*, 2001). Même si des différences sont présentes selon les souches, les caractéristiques principales sont conservées.

Le LEE comprend 3 régions (figure 2) : (i) une région proximale qui comprend les gènes codant pour un sys-

tème de sécrétion de type III (TTSS) (pour revue, Ghosh, 2004 ; He *et al.*, 2004 ; Tampakaki *et al.*, 2004) ; (ii) une région centrale comprenant les gènes *tir* codant pour le récepteur à l'intimine et le gène *eae* codant pour la protéine intimine ; (iii) une région distale comprenant les gènes *espA*, *espB* et *espD* (pour *E. coli* secreted protein) codant pour des protéines sécrétées par le système de sécrétion de type III et constituant le « translocon » permettant d'injecter les protéines effectrices dans le cytoplasme de la cellule hôte. Au niveau transcriptionnel, le LEE comprend 5 unités de transcription LEE 1 à LEE 5 (figure 2).

s4.2.2. Mécanisme de la lésion

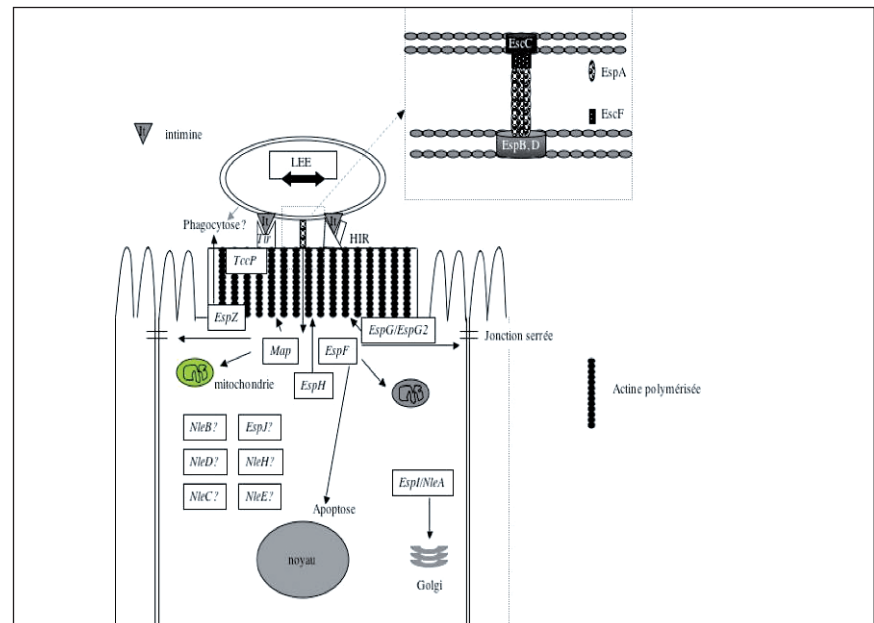
La clé du mécanisme réside dans le TTSS porté par le LEE. En bref, la bactérie doit entrer en contact avec la cellule cible ce qui va déclencher la transcription des gènes qui codent pour le système de sécrétion. Le TTSS est aussi appelé « mécanisme de sécrétion par contact ». Il agit à la manière d'une seringue moléculaire. Il consiste en une aiguille moléculaire (le translocon) qui va permettre d'effectuer la jonction entre la paroi de la bactérie et la cellule hôte. Ensuite, via cette aiguille, les protéines effectrices sont injectées du cytoplasme de la bactérie vers celui de la cellule hôte où elles vont exercer leur activité biochimique en perturbant le métabolisme de la cellule (figure 4).

La première étape consiste donc en un attachement de la bactérie à la cellule épithéliale. Il faut donc rechercher les adhésines qui pourraient remplir cette fonction.

Pour les STEC, plusieurs candidats ont été proposés : les « *long polar fimbriae* » (Torres *et al.*, 2002),

la protéine IhA (Tarr *et al.*, 2000) et le facteur Efa1 (EHEC factor for adherence) chez les STEC non-O157 (Nicholls *et al.*, 2000). En ce qui concerne les STEC O157:H7, l'intimine reste l'adhésine la plus étudiée et son rôle dans l'adhésion semble essentiel à la fois *in vivo* et *in vitro*. Quoi qu'il en soit, via un ou plusieurs mécanismes, la bactérie entre en contact avec la cellule cible. Il en résulte l'activation du système de sécrétion de type III qui injecte dans le cytoplasme de la cellule épithéliale différentes protéines effectrices. Parmi celles-ci, notons la protéine Tir qui vient se localiser au niveau de la membrane plasmique de la cellule pour servir de

Figure 4 : Schéma des mécanismes de l'interaction entre un *E. coli* porteur du LEE et un entérocyte.



La bactérie est intimement liée à l'entérocyte (A), il en résulte une activation du système de sécrétion de type III qui conduit à la formation du translocon (B) constitué des protéines EscC, EspA, EspF et EspB et EspD. Ce translocon agit comme une aiguille moléculaire permettant l'injection des protéines effectrices qui sont essentiellement Tir, EspF, EspG, EspH, EspI, EspJ et Map. Ces protéines entraînent un réarrangement du cytosquelette conduisant à la formation du piédestal mais aussi à la destruction des jonctions serrées.

récepteur à l'intimine. Il en résulte un attachement plus intime de la bactérie à la cellule épithéliale. L'attachement de la bactérie entraîne une cascade biochimique complexe dans le cytoplasme de la cellule eucaryotique se traduisant notamment par une action sur le cytosquelette (actine, microtubules, filaments intermédiaires) entraînant la destruction de l'actine des microvillosités et leur effacement. Parmi les modifications enregistrées, on note aussi une série de phosphorylations suite à l'activation de protéines kinase. Une accumulation d'actine au niveau du site de fixation de la bactérie (figure 1) donnant lieu à une image en piédestal est observée. Au niveau de la barrière intestinale cela se traduit par (i) la destruction de la fonction de la barrière intestinale incluant une augmentation de la perméabilité des jonctions serrées (Muza-moons *et al.*, 2003) et une diminution de la résistance transépithéliale ; (ii) une action sur les mitochondries avec perte du potentiel de membrane (Kenny and Jepson, 2000) ; (iii) l'inhibition du cycle cellulaire ; (iv) l'induction de l'apoptose (Marches *et al.*, 2003).

Au niveau physiologique, cela se traduit par une production d'IL-8, une transmigration des polymorphonu-

cléaires et de la diarrhée (Savkovic *et al.*, 2001).

4.2.3. Les protéines impliquées

L'intimine

L'analyse des séquences des protéines intimine de différentes souches pathogènes montre que les régions N terminales sont fortement conservées mais que les régions C terminales varient considérablement. Les trois premiers quarts de l'intimine (704 acides aminés en partant de l'extrémité N terminale) montrent 94 % d'identité, tandis que l'extrémité C terminale présente seulement 49 % d'identité (China, 2000).

Au moins 17 variants de l'intimine sont décrits à ce jour (α , β , γ , ϵ , η , ι , κ , λ , μ , ν , ρ , σ , τ , ξ , ζ) comprenant également des sous-types (Adu-Bobie *et al.*, 1998 ; Oswald *et al.*, 2000 ; Tarr et Whittam., 2002 ; Zhang *et al.*, 2002b ; Jores *et al.*, 2003). Elle possède deux types de récepteurs, un récepteur cellulaire eucaryotique comme la nucléoline pour les cellules Hep-2 (Sinclair et O'Brien, 2002) et un récepteur d'origine bactérienne Tir (Translocated Intimin Receptor).

Les protéines du système de sécrétion de type III

L'archétype des systèmes TTSS est le système *ysc* (*Yersinia secretion*) de *Yersinia enterocolitica*. Par homologie, les gènes codant pour le TTSS d'*E. coli* ont été appelés *esc* (*E. coli secretion*).

Ainsi, le TTSS des souches STEC comprend au moins 12 gènes. À côté des gènes du TTSS proprement dit on trouve les gènes codant pour les chaperonines (*ces AB*, *ces D*, *cesD2*, *ces F*, *cesT*) et les gènes codant pour les protéines effectrices.

Les protéines formant le translocon

L'aiguille moléculaire encore appelé « translocon » est la structure qui fait la jonction entre la bactérie et la cellule eucaryote et qui permet l'injection des protéines effectrices dans la cellule cible. Il est composé de protéines EspA (25 kDa) qui s'associent à la manière de la flagelline d'un flagelle pour constituer une structure filamenteuse de 12 nm de diamètre et de 6 nm de long (Crepin *et al.*, 2005). Cette structure est ancrée dans la membrane externe de la bactérie par les protéines EscF et EscJ et à la membrane plasmique de la cellule cible par les protéines EspB (38 kDa) et EspD (40 kDa) (figure 4). Les gènes *espA*, *espD* et *espB* forment un opéron situé en aval du gène *eae* sur le LEE (figure 2).

Les protéines effectrices codées par le Locus of Enterocyte Effacement (LEE)

La protéine Tir est une protéine de 90 kDa sécrétée par le TSS des STEC et qui vient s'insérer dans la membrane plasmique de la cellule cible pour y servir de récepteur à l'intimine (Deibel *et al.*, 1998). Tir agit comme récepteur sous forme d'un dimère (Luo *et al.*, 2000). La liaison de l'intimine à Tir génère un phénomène de réticulation qui lie les protéines Tir sous la bactérie adhérente (Garmendia *et al.*, 2005). La partie intracellulaire de la protéine Tir interagit alors avec des protéines d'adhésion focale et des protéines du cytosquelette conduisant à la formation d'un piédestal riche en actine sous la bactérie adhérente (Garmendia *et al.*, 2005).

EspB, en plus de jouer un rôle dans la translocation des protéines sécrétées agit aussi comme effecteur en agissant sur le cytosquelette via l' α -caténine

(Kodama *et al.*, 2002). Il en résulte la formation de fibres de stress.

EspF est une protéine riche en proline de 21 kDa codée par un gène situé à l'extrémité 3' du LEE. Elle joue un rôle dans la destruction de la fonction de barrière de l'intestin via une action sur les jonctions serrées (McNamara *et al.*, 2001). EspF est aussi impliquée dans la perméabilisation de la membrane des mitochondries. EspF semble aussi jouer un rôle dans l'apoptose de la cellule cible. Enfin, EspF joue un rôle direct dans le remodelage des microvillosités. Chez les EHEC, d'autres gènes *espF* appelés U et M-espF sont présents sur le chromosome en dehors du locus de l'enterocyte-effacement ce qui complique l'étude de la fonction de la protéine car un simple mutant *espF* ne suffit pas (Viswanathan *et al.*, 2004).

EspG est une protéine de 44 kDa (Elliott *et al.*, 2001) qui joue un rôle dans la formation des fibres de stress et la destruction des microtubules des microvillosités en interagissant avec la tubuline (Matsuzawa *et al.*, 2004). EspG présente une certaine homologie avec la protéine VirA impliquée dans l'invasion des cellules épithéliales par *S. dysenteriae* (Elliott *et al.*, 2001).

EspH est une protéine de 19 kDa qui se localise dans la membrane de la cellule cible et joue un rôle dans la modulation de la structure du réseau d'actine affectant la formation du piédestal.

EspZ est une protéine sécrétée, décrite récemment qui s'accumule sous le site d'attachement de la bactérie dans la région du piédestal (Kanack *et al.*, 2005).

La protéine Map pour « Mitochondrie-associated-protein » est une protéine qui interagit avec la membrane de la mitochondrie. Map a trois fonctions principales (i) perturbation du potentiel de membrane de la mitochondrie, (ii) formation de filopodes au site d'attachement de la bactérie, (iii) altération des jonctions serrées et de la perméabilité intestinale. On voit donc que les actions de EspF et de Map sont synergiques (Garmendia *et al.*, 2005).

Les protéines effectrices non-codées par le Locus of Enterocyte Effacement (LEE)

Le TTSS permet aussi la sécrétion de protéines qui ne sont pas codées par le LEE. Parmi celles-ci, citons

TccP, EspI, EspJ, NleB, NleC, NleD, NleE, NleF, et NleH. (Deng *et al.*, 2004). La protéine EspI (appelée aussi NleA pour Npn LEE *Encoded protein A*) est codée par un prophage et interagit avec l'appareil de Golgi de la cellule cible. La protéine EspJ est codée par le prophage CP-933U, elle n'est pas impliquée dans la formation de la lésion d'attachement et d'effacement mais plutôt dans la survie du STEC chez l'hôte et dans la transmission du pathogène. La protéine TccP (*Tir cytoskeleton coupling protein*) codée par le prophage cp-933 est une protéine riche en proline homologue à EspF. Elle sert de lien entre Tir et le cytosquelette en interagissant avec la protéine N-WASP qui stimule la polymérisation de l'actine. Le rôle des autres protéines n'est pas encore clairement élucidé (Garmendia *et al.*, 2005).

Un nouvel effecteur appelé Cif (*Cycle inhibitory factor*) a été identifié, effectivement injecté par le système codé par le LEE. Cette protéine est responsable du blocage du cycle cellulaire en phase G2/M induit par les EPEC et les EHEC. Elle est codée par un bactériophage dont le génome est inséré dans le chromosome de la bactérie (Charpentier et Oswald, 2004).

4.3. Les autres facteurs potentiels de virulence

4.3.1. Les autres îlots de pathogénicité

Un îlot de pathogénicité appelé PAI O122 est présent chez la plupart des EHEC. Pour la plupart des souches le LEE et le PAI O122 sont liés physiquement mais ils sont éloignés chez les STEC O157 (Morabito *et al.*, 2003). Le PAI O122 code pour l'adhésine Efa1 mais le gène *efa1* est tronqué dans le PAI O122 des souches STEC O157 (Caprioli *et al.*, 2005).

Un autre îlot de pathogénicité appelé HPI (*High-Pathogenicity-Island*) a été reporté dans les STEC O26 mais pas chez les STEC O157, O103 et O111. Il est homologue à un PAI trouvé chez *Yersinia* qui code pour des sidérophores (Caprioli *et al.*, 2005).

4.3.2. L'adhésine SAA

Certains STEC ne possèdent pas le LEE quoiqu'elles produisent des pathologies comme le SHU. Ces souches possèdent une adhésine appelée

SAA (pour STEC *Autoagglutinating Adhesin*) qui est une protéine de surface de 516 acides aminés qui possède une certaine homologie avec la protéine YadA de *Y. enterocolitica* et qui est présente chez des STEC des sérotypes O113:H21, O48:H21, O9:H21 isolées de cas de SHU (Paton *et al.*, 2001).

4.3.3. Les plasmides

Les STEC O157 possèdent un plasmide de 90 kDa appelé pO157. Il code pour 35 protéines dont certaines pourraient être impliquées dans la virulence (Burland *et al.*, 1998). C'est le cas de l'opéron *ehxA* qui code pour l'entérohémolysine, le gène *katP* qui code pour une catalase-peroxydase et le gène *espP* qui code pour une sérine protéase, le gène *toxB* qui code pour une adhésine proche de Eaf1. De grands plasmides sont aussi présents chez les STEC non-O157, ils portent aussi les gènes codant pour l'entérohémolysine mais plus rarement les gènes *katP* et *esp* (Caprioli *et al.*, 2005).

4.3.4. L'entérotoxine entéroaggrégative thermostable

La toxine entéroaggrégative thermostable (EAST1) est présente chez la plupart des *E. coli* responsables de diarrhée (Nataro et Kaper, 1998). Le gène *east1* a été mis en évidence chez des EHEC responsables d'épidémies au Japon et appartenant aux sérotypes O157:H7, O26, O111 et O145.

4.3.5. La toxine cytolétale distendante

Un opéron codant pour une toxine cytolétale distendante (CDT) a été identifié chez les STEC O157:H- et les STEC O157:H7. La toxine CDT a d'abord été décrite chez les *E. coli* nécrotoxigènes et entéropathogènes où elle exerce une activité cytotoxique en agissant sur le cytosquelette (Clark *et al.*, 2002).

5. METHODES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE SHIGATOXINES (STEC) DANS LES ALIMENTS

Différentes méthodes de détection ont été développées pour la détection de STEC O157 et autres STEC. Elles ont recours à des méthodes immunologiques (méthodes de séparation-concentration comme l'immuno-séparation magnétique ou des systèmes rapides de détection immunologiques comme les méthodes ELISAs (*enzyme-linked immunosorbent assays*)) (Vimont, 2006) et des méthodes génétiques.

5.1. Isolement et détection de *E. coli* O157

5.1.1. Utilisation des caractéristiques biochimiques pour l'isolement de *E. coli* O157

La plupart des réactions biochimiques des STEC sont typiques des *E. coli* et répondent au test IMVIC (Indole-Rouge Methyl-Voges-Proskauer, Citrate) qui permet de les différencier des autres entérobactéries. Environ 93 % des souches d'*E. coli* d'origine humaine fermentent le sorbitol en 24 heures et sont β -glucuronidase positives, à l'inverse, la grande majorité des STEC O157 ne fermentent généralement pas le sorbitol (SOR-) et ne produisent pas de β -glucuronidase active. Ainsi, l'absence de fermentation du sorbitol a justifié l'utilisation de la gélose Mac-conkey au sorbitol (SMAC) (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003).

Cependant, certaines des souches STEC O157 fermentant le sorbitol en 24 heures (SOR+) et possédant une activité β -glucuronidase (GUD+) ont été impliquées dans des cas d'infections, de SHU (Gunzer *et al.*, 1992 ; Karch *et al.*, 2001) et d'épidémies probablement d'origine alimentaire à partir de saucisses contaminées (Ammon, 1999). Ces derniers STEC O157 (SOR+ et GUD+) ainsi que les autres sérotypes de STEC ne peuvent pas être mis en évidence par les méthodes officielles de contrôle des aliments. Leur détection fait généralement appel aux méthodes d'immunodiagnostic et méthodes génétiques.

STECO157 croît difficilement aux températures d'incubation (44°C - 45°C) utilisées pour le dénombrement des *E. coli*. Il se développe rapidement à des températures comprises entre 30°C et 42°C avec un temps de génération de 0,49 heure à 37°C et 0,64 heure à 42°C (Vernozy-Rozand, 1999). Ces différentes caractéristiques justifient l'utilisation de milieux appropriés et

une température d'incubation proche de 42°C pour la recherche des STEC O157.

5.1.2. Tests immunodiagnostiques utilisant des anticorps dirigés contre l'antigène O157

Des tests immunologiques très spécifiques et sensibles utilisés utilisant des anticorps dirigés contre l'antigène O157 sont utilisés pour la détection des *E. coli* O157 dans les aliments. Ils nécessitent une étape préliminaire d'enrichissement dans un milieu approprié. Les tests existants sur le marché sont nombreux. Ils comprennent des tests conventionnels ELISA en microplaques, des systèmes immunologiques en une étape et des systèmes complètement automatisés. Les méthodes immunologiques donnent un résultat en 15 minutes (tests immunochromatographiques) ou en 2 heures (système ELISA en microplaques) après une phase d'enrichissement d'une durée de 24 heures. Par conséquent, la durée de l'analyse est réduite à un jour au lieu de trois jours nécessaires pour la méthode conventionnelle.

Les méthodes immunologiques en une étape sont très utilisées par les industriels car rapides et simples. Le kit consiste en un support plastique contenant une membrane imprégnée de particules d'or ou de latex recouverte d'anticorps spécifiques d'*E. coli* O157:H7, un puit pour l'échantillon et une fenêtre de test et de contrôle. Les bactéries sont déposées au fond du puit destiné à l'échantillon alimentaire, puis diffusent le long de la membrane jusqu'à la zone test contenant l'anticorps anti-O157. L'apparition d'une ligne colorée dans la fenêtre test après 10 à 20 minutes indique un résultat positif signant la présence probable de *E. coli* O157 dans l'aliment. La limite de détection de ces tests est en moyenne de 10^5 *E. coli* O157 par ml de bouillon de pré-enrichissement. Quand elle est comparée à la méthode ISO16654, l'immunochromatographie se montre plus sensible (Van Amerongen et Koets, 2005).

Le système VIDAS ECO (Biomérieux, France) permet la détection entièrement automatisée de *E. coli* O157 après une phase d'enrichissement de 24 heures. Le principe de ce kit est celui d'un système ELISA. L'enrichissement très sélectif basé sur un bouillon CT-MAC

permet de réduire le nombre de faux positifs. Les kits décrits ne recherchent que l'antigène somatique O157 (parfois associé à l'antigène H7). Un résultat positif signe la présence de l'antigène cible et n'apporte qu'une information qui doit être confirmée en passant nécessairement par l'isolement et l'identification de la souche bactérienne à l'origine du message immunologique positif. Des réactions immunologiques croisées se produisent avec d'autres espèces bactériennes telles : *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *Yersinia enterocolitica* O9, *Salmonella* groupe N et *Stenotrophomonas maltophilia* 555) (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003). Lors d'une réponse positive pour le système VIDAS ECO une immunoconcentration est réalisée avec le système VIDAS ICE (BioMérieux) qui permet de capturer les bactéries ciblées pour les isoler sur des géloses spécifiques.

5.1.3. Protocole de recherche de *E. coli* O157 dans l'aliment

Comme toute méthode classique d'isolement de bactéries pathogènes à partir d'un aliment, le protocole inclut (i) une étape d'enrichissement en bouillon pour revivifier et multiplier les bactéries stressées de l'aliment, (ii) une étape d'enrichissement spécifique ou d'immuno-concentration pour

sélectionner la bactérie recherchée, (iii) un étalement sur milieu sélectif et une confirmation biochimique ou immunologique des colonies caractéristiques (figure 5).

Etape d'enrichissement

Comme la dose infectieuse est basse, de nombreux milieux d'enrichissement ont été étudiés pour permettre aux cellules bactériennes de se multiplier jusqu'à des niveaux détectables et souvent de supprimer la croissance des bactéries Gram positives et en grande partie des Gram négatives telles que *Proteus spp* et *Aeromonas spp*. Parmi ceux utilisés pour la détection des STECO157, le bouillon tryptique soja (TSB) additionné de novobiocine (mTSB utilisé dans la norme ISO16654) ou d'acriflavine pour réduire le nombre de microorganismes à Gram positif. Un autre milieu décrit est constitué d'eau peptonnée tamponnée additionnée de vancomycine, de cefsulodine et de cefixime pour supprimer la croissance des bactéries à Gram positif et à Gram négatif comme *Aeromonas spp.* et *Proteus spp.* (Weagant et Round, 2001).

Beaucoup d'études entreprises recommandent d'incuber le milieu d'enrichissement à une température proche de 42°C (Ogden *et al.*, 2001) pendant une courte durée (6 heures). Bolton et collaborateurs (1996) ont recommandé pour la détection

des STEC O157 dans les viandes, le bouillon (mTSB) incubé à 42°C pendant 6 heures comme milieu d'enrichissement suivi d'une étape d'enrichissement immunomagnétique et d'un isolement sur milieu CT-SMAC incubé à 42°C. Ce dernier milieu a l'avantage d'inhiber la multiplication des autres bactéries sorbitol négatives comme *Hafnia alvei*. C'est cette dernière méthode qui a été reprise dans la norme ISO16654 (International Organization for Standardization, 2001) (figure 5).

Etape de séparation/concentration

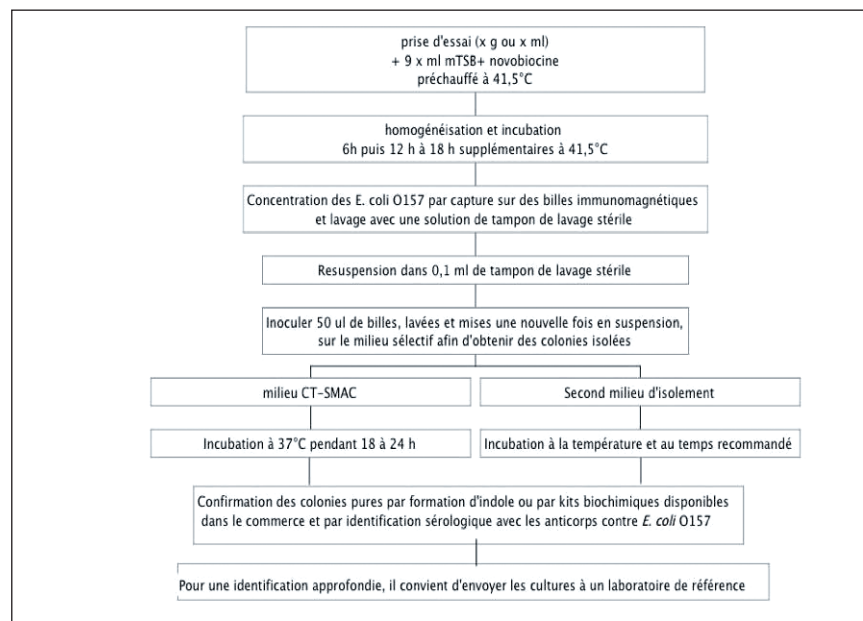
Dans le but de réduire la durée des analyses microbiologiques, des techniques de type séparation/concentration ont été développées. Ces techniques sont représentées par la centrifugation, la filtration, des systèmes bio-absorbants à base de lectine augmentant la sensibilité de la détection. La technique la plus efficace serait celle de la séparation immuno-magnétique qui est techniquement simple à réaliser et spécifique pour l'isolement de STEC O157 (Vernozy-Rozand, 1999). Après enrichissement, les billes sont généralement mises en culture sur des milieux sélectifs.

Bennet et collaborateurs (1996) ont prouvé que les systèmes de séparation concentration immuno-magnétique (Dynabeads anti *E. coli* O157, Dynal Ltd, UK) repris dans la norme ISO16654 (International Organization for Standardization, 2001) ou les systèmes d'immuno-concentration type VIDAS ICE (Biomérieux, France) actuellement commercialisés permettent la détection de quelques cellules d'*E. coli* O157 dans 25 g de viande hachée de bœuf un jour plus tôt que les analyses classiques.

Isolement de *E. coli* O157 sur milieux sélectifs

Après enrichissement, les billes magnétiques ou les bactéries du bouillon d'enrichissement sont étalées et mises en culture sur des milieux sélectifs. Comme les STEC O157 ne fermentent pas le sorbitol à l'opposé des autres *E. coli*, le milieu de base utilisé est le milieu de Mac Conkey au sorbitol (SMAC). Des modifications de la gélose SMAC (ajout de cefixime et de tellurite : milieu CT-SMAC) ont été mises au point pour augmenter le caractère sélectif vis-à-vis des STEC O157 (Zadik *et al.*, 1993).

Figure 5 : Mode opératoire d'isolement des *E. coli* O157 à partir d'un aliment suivant la norme ISO16654 (International Organization of Standardization, 2001)



D'autres milieux d'isolement sélectif et sensible comme le « Rainbow agar O157 » ont été testés en combinaison avec des méthodes génétiques (PCR) pour détecter les souches de STEC O157 dans les échantillons de viandes (Radu *et al.*, 2000).

De nombreux milieux chromogènes ont été mis au point, deux sont spécifiques du sérotype O157: H7 (CHROMagar *E. coli* O157:H7 et O157:H7 ID) (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003). L'utilisation de ces milieux pour la détection des *E. coli* O157 fermentant le sorbitol est recommandé (De Boer et Heuvelink, 2000).

Tests de confirmation et d'identification des *E. coli* O157

Après isolement, les colonies caractéristiques de *E. coli* O157 sont confirmées par des tests biochimiques (test IMVIC ou utilisation de galeries API20E) et une agglutination par des billes de latex sensibilisées par des anticorps anti O157 (Vernozy Rozand, 1999). Le contrôle de la présence du flagelle H7 exige l'ensemencement de la souche étudiée sur une gélose mobilisée, de manière à favoriser la synthèse du flagelle avant son sérotypage à l'aide d'anticorps anti H7. Ces étapes de confirmation sont simples et faciles mais longues (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003).

5.2. Détection des *E. coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) non-O157

Les STEC non-O157 n'ont pas de caractéristiques biochimiques communes permettant leur isolement sur un milieu particulier. Une solution alternative pour l'isolement de ces souches est l'utilisation de la gélose « entérohémolysine ». La méthode est fondée sur le fait qu'une proportion importante des STEC a la propriété de produire une entérohémolysine décelable sur gélose contenant des érythrocytes de mouton lavés, additionnés d'ions Ca^{2+} (Beutin *et al.*, 1988). Les colonies présentant une hémolyse caractéristique doivent toutes être confirmées comme STEC par mise en évidence du gène codant les Shigatoxines (Beutin *et al.*, 1996). D'autre part, une proportion de STEC non-O157 et STEC O157 fermentant le sorbitol, peuvent ne pas produire l'entérohémolysine et ne seront

pas détectées sur gélose au sang. De ce fait, leur recherche nécessite souvent d'utiliser directement la méthode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) avec l'utilisation d'amorces spécifiques des gènes *stx* codant les Shigatoxines pour confirmer leur appartenance à ce groupe de pathogènes. Il est à noter que des billes magnétiques recouvertes d'anticorps dirigés contre d'autres sérotypes de STEC (O26, O111, O118, O91, O145) ont été développées (Dynabeads, Invitrogen) et permettent un enrichissement sélectif.

Dans certains cas, il est possible de résoudre le problème du milieu sélectif. En effet, la plupart des EHEC O26 ne fermentent pas le rhamnose et le dulcitol et produisent l'entérohémolysine ce qui permet de les détecter spécifiquement (Léomil *et al.*, 2005). Des milieux d'enrichissement et d'isolement pour les STECO26 et STEC O111 ont aussi été développés. Pour ce faire, deux procédures de détection de *E. coli* O26 et de *E. coli* O111 dans les viandes hachées de bœuf ont été décrites (Catarama *et al.*, 2003).

La recherche de *E. coli* O26, consiste en une étape d'enrichissement de l'échantillon incubé à 41,5°C dans un bouillon tryptone soja additionné de cefixime (50 microgrammes⁻¹), de vancomycine (40 mg⁻¹) et de tellurite de potassium (2,5 ml⁻¹) suivie d'une étape de séparation/concentration (IMS) et d'un isolement sur milieu MacConkey auquel on a ajouté du rhamnose (20 g⁻¹), de la cefixime (50 microgrammes⁻¹) et du tellurite de potassium (2,5 mg⁻¹) (CT-RMAC).

La recherche de *E. coli* O111 consiste en une étape d'enrichissement dans le bouillon tryptone soja additionné de cefixime (50 microgrammes⁻¹), de vancomycine (40 mg⁻¹) mais sans adjonction de tellurite de potassium suivie d'une étape de séparation/concentration (*Immunomagnetic separation*, IMS) et d'un isolement sur une gélose chromogène (*chromocult agar*) additionnée de cefixime (50 microgrammes ml⁻¹), de cefsulodine (5mg⁻¹) et de vancomycine (8mg⁻¹) (Catarama, 2003).

5.3. Détection de la production de Shigatoxines

5.3.1. Effet cytopathogène des Shigatoxines

La détection de la production de Shigatoxines se fait essentiellement par la mise en évidence du pouvoir cyto-

pathogène des Shigatoxines sur les lignées cellulaires Véro (Richardson *et al.*, 1988). Ainsi peuvent être testés des échantillons fécaux, des cultures bactériennes et des aliments.

Les colonies se développent en bouillon; les surnageants de cultures sont ajoutés à la lignée cellulaire Véro. Ces dernières prennent une forme ronde et se détachent du support en présence de shigatoxines. La croissance des STEC dans des milieux dépourvus de fer permet la production augmentée des toxines Stx1 mais pas des Stx2. (O'Brien *et al.*, 1982)

5.3.2. Tests immunodiagnostiques

Pour confirmer que l'effet cytopathogène exercé sur les cellules Véro est effectivement dû aux Shigatoxines, on peut réaliser des tests de neutralisation en utilisant des anticorps dirigés contre les différents types de Shigatoxines (Scotland *et al.*, 1988). Quelques techniques ELISA permettant la détection des Shigatoxines ont été décrites. Les systèmes permettant la fixation des Shigatoxines utilisent des glycolipides mimant le récepteur Gb3. Dans d'autres études des anticorps monoclonaux anti-Shigatoxines ont été utilisés. Des kits ELISA (RIDASCREEN Verotoxin ELISA, Verotoxin Cypress Diagnostics) permettant la détection des Shigatoxines dans les matières fécales sont commercialisés et peuvent être utilisés dans les laboratoires de diagnostic classique. De même, les tests d'immunochromatographie permettent la détection des toxines Stx1 et Stx2 (système Singlepath®, Merck).

5.4. Méthodes génétiques pour la détection des STEC dans les aliments

La détection des gènes codant les facteurs de virulence s'effectue soit directement sur le génome total de la bactérie isolée par hybridation avec des sondes ADN spécifiques marquées (Mainil *et al.*, 1993) soit après amplification d'une partie des gènes recherchés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Saiki *et al.*, 1988), par PCR ELISA ou PCR en temps réel (China *et al.*, 2002).

5.4.1. Les systèmes basés sur la "Polymerase Chain Reaction"

La PCR peut être réalisée à partir de l'ADN d'une culture pure, de matri-

ces alimentaires ou de matières fécales. L'application peut être effectuée directement après enrichissement ou après isolement des souches sur milieu spécifique (méthodes conventionnelles). La PCR est très sensible et spécifique. Grâce à cette technique, l'ADN est amplifié à un niveau suffisant même lorsque le nombre de bactéries dans l'échantillon est très faible (Bouvet et Vernozy-Rozand, 2000).

D'autres techniques ont été développées ces dernières années comme la PCR ELISA ou PCR en temps réel (China *et al.*, 2002). La PCR ELISA permet une détection du produit PCR en utilisant un lecteur de microplaques utilisé pour les tests ELISA. Une des amorces est biotinylée. Le produit PCR est immobilisé dans les plaques multi-puits recouvertes de streptavidine qui a une affinité pour la biotine.

Le produit PCR est détecté par une sonde marquée avec une molécule cible (fluorescéine, digoxigénine). L'hybridation de la sonde est mise en évidence en utilisant un anticorps couplé à une enzyme (peroxydase ou phosphatase alcaline) et dirigé contre la molécule cible.

La fixation de l'anticorps est alors révélée par la réaction enzymatique. Cette étape permet de tester de nombreux échantillons dans un format de microplaques et en utilisant le matériel type ELISA (Fach *et al.*, 2001). Cette technique implique cependant de nombreuses opérations postérieures à la PCR.

Toutes les techniques décrites sont des méthodes en point final, on analyse les résultats en fin de PCR. De nouveaux développements technologiques permettent de réaliser la PCR en temps réel en suivant l'amplification au cours des cycles.

La « PCR en temps réel » permet de mesurer l'accumulation du produit de PCR à chaque cycle au cours de la réaction d'amplification. Le principe est d'utiliser un marquage fluorescent du produit de la PCR. Le fluorochrome est ajouté à la réaction de PCR. La réaction de PCR et la détection du produit de PCR sont donc simultanées.

L'appareil de PCR en temps réel mesure l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Les données concernant la quantité du

produit amplifié sont enregistrées « en temps réel ».

Pour la détection de l'amplicon, on peut utiliser un marquage non spécifique ou spécifique.

Le marquage non spécifique utilise comme fluorochrome le SybrGreen® qui se lie à l'ADN bicaténaire. Son manque de spécificité lui permet de se lier indifféremment aux produits de PCR spécifique et non spécifique. Pour vérifier la spécificité du signal obtenu, on réalise une courbe de dissociation permettant de déterminer la température de fusion de l'amplicon.

Le marquage spécifique est utilisé à l'aide d'une sonde spécifique. Dans le cas d'une sonde Taqman™, la sonde est marquée deux fois : un fluorochrome « *quencher* » et un fluorochrome « *reporter* ». La fluorescence émise par le *reporter* est absorbée par le *quencher* situé dans son voisinage et aucune fluorescence n'est détectée. Au cours de la polymérisation, la Taq polymérase dégrade la sonde située sur son chemin et libère le *reporter* du *quencher*.

Les fluorophores sont plus éloignés entre eux et l'émission du *reporter* est augmentée. L'augmentation du signal correspondant à la composante du fluorophore *reporter* est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR. Signalons que d'autres types de sondes peuvent être utilisées tels les « *molecular beacons* » ou les sondes d'hybridation mais elles sont d'un usage plus restreint (China *et al.*, 2002).

Les principaux systèmes PCR développés pour détecter ou caractériser les STEC sont présentés dans le tableau I. Les cibles génétiques principales sont les gènes *stx1* et *stx2*, le gène *eae* ainsi que le gène *ehxA*. Certains systèmes sont spécifiques des *E. coli* O157:H7. Les gènes ciblés sont le gène *rfbE* codant pour l'antigène O157, le gène *fliCH7* codant pour l'antigène H7 ou le gène *uidA* codant pour la β -glucuronidase dont la séquence (mutation du gène à +93) est spécifique de ces souches (Yoshitomi, 2006).

5.4.2. L'hybridation

La détermination du pathotype de la souche peut aussi s'effectuer par la technique d'hybridation sur colonies (Mainil *et al.*, 1993). Cette technique consiste à immobiliser l'ADN géno-

mique dénaturé de la colonie à étudier sur une membrane et d'utiliser en solution des sondes marquées spécifiques des gènes recherchés (*eae*, *stx1*, *stx2*...).

Cette technique, très populaire dans les années '80, a eu tendance à être supplantée dans les années '90, par les techniques rapides de PCR. Cependant, récemment, l'hybridation a de nouveau connu un essor certain grâce à la miniaturisation du procédé sous forme de puces à ADN. Dans cette configuration, des sondes oligonucléotidiques sont fixées sur un support solide, le plus souvent, une lame de verre de type lame de microscopie. Ces sondes correspondent à des gènes de virulence et forment un damier sur la surface solide. L'avantage de la robotisation du procédé est la capacité à pouvoir multiplier presque à l'infini (plusieurs milliers de sondes par cm carré) le nombre de sondes fixées. Il sera donc possible de détecter pour une même souche la présence de nombreux gènes d'intérêt. Il peut s'agir de gènes de virulence ou de gènes codant pour une résistance à un antibiotique. D'un autre côté, soit l'ADN des gènes d'intérêt est amplifié par PCR à l'aide d'amorces dont l'une est marquée (biotine, fluorochrome) soit l'ADN génomique est directement marqué (Bekal *et al.*, 2003). Ensuite on effectue l'hybridation « sonde-cible » afin de détecter la présence des gènes d'intérêt. Il est à remarquer que dans l'hybridation sur filtre classique, c'est l'ADN cible qui est fixé et la sonde marquée qui est en solution alors que dans la technologie des puces à ADN, ce sont les sondes qui sont fixées sur le support solide et l'ADN cible marqué qui se trouve en solution.

5.5. Le typage moléculaire des *E. coli* producteurs de Shigatoxines (STEC)

Il est possible de comparer entre-elles les souches isolées afin de déterminer leur degré de parenté. Il s'agit d'identifier la source d'une contamination ou de comparer des souches isolées d'endroits différents. Ces méthodes de typage sont principalement phénotypiques et génotypiques. Le typage phénotypique est basé, entre autres, sur des différences dans la production de certaines protéines comme des enzymes (« *multi locus enzyme electrophoresis typing* » ou MLEE) ou des récepteurs pour les bactério-

Tableau I : Exemples de systèmes PCR utilisés pour la détection des STEC

| Pathogène | Gènes ciblés | Technique | Référence |
|----------------------|--|---------------------------|--------------------------------|
| STEC | <i>stx1, stx2</i> | PCR-M-C-EG-H | Brian <i>et al.</i> , 1992 |
| | <i>ehxA</i> | PCR-S-C-EG | Schmidt <i>et al.</i> , 1995 |
| | <i>eae, stx1-2, ehxA</i> | PCR-M-C-EG | Fratamico <i>et al.</i> , 1995 |
| | <i>eae, stx1, stx2</i> | PCR-M-C-EG | China <i>et al.</i> , 1996 |
| | <i>cesT</i> | PCR-S-C-EG | Meng <i>et al.</i> , 1996 |
| | <i>katP</i> | PCR-S-C-EG | Brunder <i>et al.</i> , 1996 |
| | <i>stx1, stx2, stx2e, stx2d, stx2c</i> | PCR-S-C-EG-RFLP | Piérard <i>et al.</i> , 1998 |
| | <i>eae, stx1, stx2, ehxA</i> | PCR-M-C-EG | Fagan <i>et al.</i> , 1999 |
| | <i>eae, stx1, stx2</i> | PCR-M-RTST | Sharma <i>et al.</i> , 1999 |
| | <i>eae, stx1, stx2</i> | PCR-S-RTSG | Bischoff <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>stx1, stx2</i> | PCR-S-C-EG-H | Karch et Meyer, 1989 |
| | <i>stx2, stx2c</i> | PCR-S-C-EG | Tyler <i>et al.</i> , 1991 |
| | <i>stx1, stx2</i> | PCR-M-C-EG-H | Begum <i>et al.</i> , 1993 |
| | <i>stx1-2</i> | PCR-S-C-EG | Lin <i>et al.</i> , 1993 |
| | <i>stx1, stx2, eae, saa, ehxA</i> | PCR-S-C-EG | Kumar <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>toxB, stx1, stx2, eae, ihA,</i> | PCR-S-C-EG | Tarr <i>et al.</i> , 2002 |
| | <i>stx1, stx2, stx2f</i> | PCR-M-C-EG | Wang <i>et al.</i> , 2002 |
| | <i>stx2c, stx2e, eae</i> | PCR-M-C-EG | Wang <i>et al.</i> , 2002 |
| | <i>stx1, stx2</i> | PCR-M-C-EG PCR-M-RT-ST | Sharma, 2002 |
| S T E C O157 (H7) | <i>uidA, stx1, stx2</i> | PCR-M-RTSG | Yoshitomi <i>et al.</i> , 2006 |
| | <i>stx1, stx2, eaeO157, fliCH7</i> | PCR-M-C-EG | Ganon <i>et al.</i> , 1997 |
| | <i>eae</i> | PCR-S-C-EG | Adu-Bobie <i>et al.</i> , 1998 |
| | <i>eae</i> <i>espA</i> <i>espB</i> | PCR-M-C-EG | Goffaux <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>eae</i> | PCR-S-RTST | Oberst <i>et al.</i> , 1998 |
| | <i>chuA</i> | PCR-C-EG-RFLP | Kimura <i>et al.</i> , 2000 |
| | <i>rfbEO157, RfbBO157, fliCH7, SilO157</i> | PCR-ELISA | Fach <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>uidA, stx1, stx2</i> | PCR-M-C-EG | Cebula <i>et al.</i> , 1995 |
| | <i>fliCH7, stx1, stx2, eae</i> | PCR-M-C-EG | Fratamico <i>et al.</i> , 2000 |
| | <i>uidA, stx1, stx2, eae, ehxA</i> | PCR-M-C-EG | Feng <i>et al.</i> , 2001 |
| | <i>toxB</i> | PCR-S-C-EG | Tarr <i>et al.</i> , 2002 |
| | <i>ureA, B, C, D, E, F ? G</i> | PCR-S-C-EG | Friedrich <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>stx1, stx2, eaeO157</i> | PCR-M-RT-ST | Sharma <i>et al.</i> , 2003 |
| | <i>stx2d, ehxA, rfbEO157, fliCH7</i> | PCR-M-C-EG | Wang <i>et al.</i> , 2002 |
| | <i>eaeO26, eaeO111, eaeO157</i> | PCR-M-C-EG PCR-M-RT-ST | Sharma, 2002 |
| | <i>rfbEO157, fliCH7</i> | PCR-S-RTST | Perelle <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>rfbEO157</i> | PCR-S-RT-MB | Fortin <i>et al.</i> , 2001 |
| STECO157 SF | <i>sfpA, sfpDG, sfpG</i> | PCR-S-C-EG | Brunder <i>et al.</i> , 2001 |
| STECO103 | <i>gld, wzx</i> | PCR-S-RTST | Perelle <i>et al.</i> , 2005 |
| STECO111 | <i>bdl</i> | PCR-S-RT-ST | Perelle <i>et al.</i> , 2004 |
| STECO26 | <i>wzx</i> | PCR-S-RT-ST | Perelle <i>et al.</i> , 2004 |
| STECO113 | <i>wzy</i> | PCR-S-RT-ST | Perelle <i>et al.</i> , 2004 |
| STECO91 | <i>wzy</i> | PCR-S-RT-ST | Perelle <i>et al.</i> , 2004 |
| STECO55 | <i>wbgN</i> | PCR-S-RT-ST | Perelle <i>et al.</i> , 2004 |
| STECO145 | <i>ihpI</i> | PCR-S-RT-ST | Perelle <i>et al.</i> , 2004 |

PCR-M-C-EG-H= PCR multiplex classique-électrophorèse en gel d'agarose et hybridation

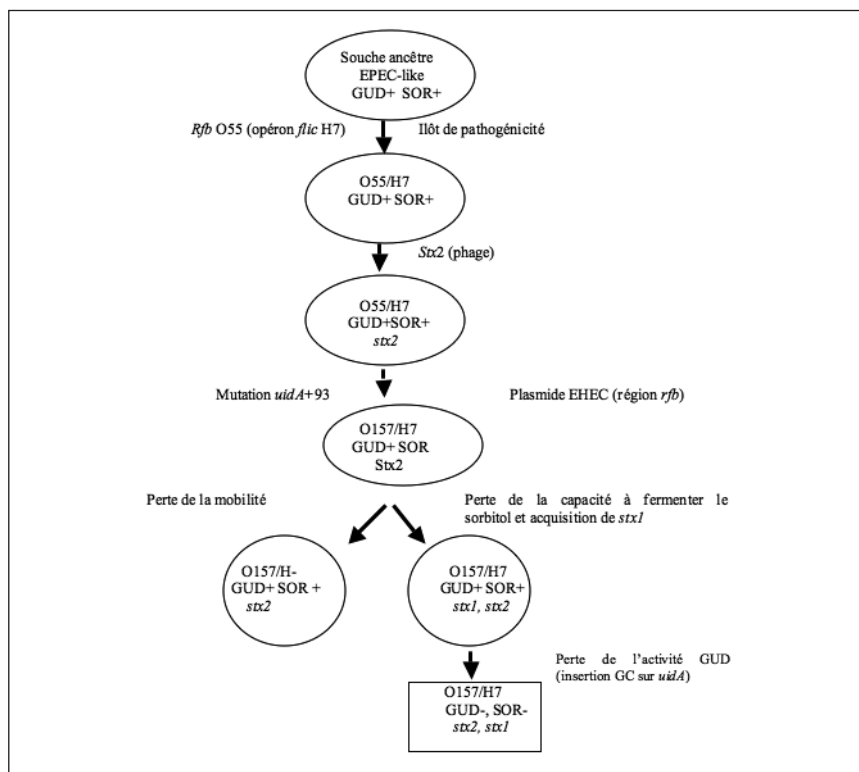
PCR-S-C-GE = PCR simplex classique-électrophorèse en gel d'agarose, PCR-M-C-GE = PCR multiplex classique-électrophorèse en gel d'agarose. PCR-S-C-EG-RFLP= PCR simplex-classique-électrophorèse en gel d'agarose- restriction fragment length polymorphism. PCR-M-RTST= PCR multiplex en temps réel avec sonde Taqman. PCR-M-RTSG= PCR multiplex en temps réel avec sybrgreen. PCR-S-RTSP= PCR simplex en temps réel avec sonde Taqman

phages (lysotypage) (Wentworth, 1963). Le typage génotypique ou génotypage est basé sur la conservation de la séquence d'ADN. Puisque le séquençage du génome reste long et fastidieux, des méthodes indirectes sont utilisées. Elles sont basées soit sur la conservation de sites de restriction (Ribotypage, Electrophorèse en champs pulsé), sur la PCR (*Random Amplification of polymorphic DNA* ou RAPD (De Wolf *et al.*, 2004) ; *repetitive element-PCR* ou Rep-PCR (Jones

et al., 2005) ou sur les deux techniques (*Amplification of random polymorphic DNA* ou AFLP (Jones *et al.*, 2005)). Enfin, dans le *multi loci sequencing typing* (MLST) (Urwin et Maiden, 2003), la séquence de différents gènes est comparée entre les souches et les mutations ponctuelles sont repérées. Le pouvoir de discrimination d'une méthode peut être défini comme le nombre de patrons différents obtenus sur le nombre de souches testées (China, 2002).

Ainsi, Grif et collaborateurs (1998) ont comparé 47 souches de STEC O157 (d'origine humaine, alimentaire ou animale) par différentes méthodes : le ribotypage, la RAPD, l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) et le lysotypage. Le ribotypage s'est montré peu discriminant, le lysotypage a montré un pouvoir discriminant de 21 % (10 patrons différents pour 47 souches). La PFGE a montré 16 patrons majeurs (soit un pouvoir de discrimination de 34 %). La RAPD, quant à elle, a per-

Figure 6 : Modèles théoriques de l'apparition de la souche EHEC O157:H7 (voir texte).



mis de discriminer toutes les souches entre elles, excepté pour les souches isolées du même échantillon de lait. Le problème majeur de la RAPD est son faible degré de reproductibilité (China, 2002). Dans une autre étude, Izumiya et collaborateurs (1997) ont comparé 825 souches de STEC O157:H7 isolées de cas humains au Japon par PFGE. Six patrons électrophorétiques (pulsotypes) ont été mis en évidence. Les souches isolées d'une même épidémie montraient le même pulsotype. Smith et collaborateurs (2000) ont comparé 71 souches de STEC O157 par PFGE et AFLP. Ces deux méthodes ont montré le même pouvoir de discrimination avec 27 patrons différents. En raison de son pouvoir discriminant important et sa bonne reproductibilité, la PFGE tend à s'établir comme la méthode de référence en matière de typage moléculaire bactérien. Des réseaux de banques de données sont constitués tant au Etats-Unis qu'en Europe via les réseaux PulseNet (Gerner-Smidt et Scheutz, 2006) (<http://www.fsis-pfge.org/pulsenet.html>). La technique de MLST pratiquée sur 9 gènes de STEC O157 s'est montrée incapable de distinguer des souches qui, par ailleurs, montraient un pulsotype différent (Noller *et al.*, 2003). Par contre, Beutin et

collaborateurs (2005) ont analysé 54 STEC O103 par PFGE et MLST. La MLST a montré 7 profils différents et la PFGE, 6 patrons différents. La MLST fait aussi l'objet de banques de données qui permettent de comparer une nouvelle souche avec les souches de la banque (www.mlst.net ; www.shigatox.net). La MLST et la PFGE semblent être les méthodes les plus prometteuses en termes de reproductibilité et de pouvoir discriminant.

6. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES SUR LES E. COLI PRODUCTEURS DE SHIGATOXINES (STEC)

Les STEC sont des agents zoonotiques. Les ruminants et essentiellement les bovins sont considérés comme le réservoir majeur de ces pathogènes responsables de maladies humaines. Les infections à STEC sont souvent sporadiques, mais elles peuvent aussi donner naissance à des épidémies de grande ampleur. Le sérotype O157 a été le premier et le plus fréquemment impliqué dans les formes graves des infections à STEC sur plusieurs continents. L'apparition de nombreux foyers d'infections liés à d'autres sérotypes de STEC a permis d'appréhender de nouvelles approches pour

mieux détecter ce type de pathogènes. Le développement des moyens de diagnostic a permis de mieux connaître différents aspects de l'épidémiologie de ces souches.

6.1. Emergence des E. coli producteurs de Shigatoxines

Les STEC montrent une pathogénicité variable pour l'homme. La virulence d'une souche varie en fonction du nombre et du type de facteurs de virulence qu'elle héberge et exprime, mais aussi en fonction du statut immunologique de l'hôte. On a montré que l'implication de bactériophages dans le transfert de gènes de virulence alliée aux mutations, permet une évolution rapide des bactéries, et peuvent être à l'origine d'émergences. Les STEC tels qu'ils sont définis auraient probablement acquis récemment la plupart de leurs gènes de virulence par transfert horizontal de matériel génétique. C'est ce que semble montrer l'analyse moléculaire et la comparaison de la distribution des gènes spécifiques de virulence de cette famille (Caprioli *et al.*, 2005).

L'explication logique de l'émergence des STEC comme agents pathogènes serait la présence de ces gènes sur des éléments mobiles, comme les gènes *stx1* et *stx2* situés sur des prophages, le gène *eae* (intimine) sur un îlot de pathogénicité et le gène *ehxA* et *katP* sur un plasmide qui auraient été transmis horizontalement en plusieurs étapes. Les variations situées au niveau de ces éléments génétiques seraient à l'origine de l'évolution du génome des STEC (Caprioli *et al.*, 2005). Différentes hypothèses ont été développées quant à leur émergence. Les relations clonales entre les EPEC et les EHEC sont très complexes et de nombreuses souches appartiennent à des sérotypes communs aux deux pathovars.

Les EHEC seraient un groupe de clones dérivant des E. coli entéropathogènes hébergeant le gène d'attachement effacement (*eae*). L'acquisition des gènes *stx* par deux types de clones EPEC aurait conduit à l'émergence de deux lignées majeures d'EHEC : (i) la lignée EHEC-1, constituée de souches O157:H7 et O145:H-, considérée comme hautement pathogène pour l'homme où le LEE aurait été acquis et intégré au niveau du site *selC* et (ii) la lignée EHEC-2, constituée de souches O26:H11 et O111:H8, où le

LEE aurait été acquis au niveau du site *pheU* (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003).

6.1.1. Origine du clone O157 ou preuve moléculaire de l'émergence de *E. coli* O157:H7

L'acquisition d'ADN étranger par une bactérie est un mode d'évolution bien connu. Elle peut se faire entre deux bactéries de la même famille (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Erwinia*) ou même entre bactéries de familles différentes. Les mécanismes qui sont intervenus lors de l'émergence et l'évolution des clones EHEC ne sont pas complètement élucidés. Cependant les différences génétiques observées dans le génome de ces pathogènes et *E. coli* K-12 révèlent l'existence de nombreux échanges génétiques et la présence d'îlots de gène supplémentaires appelés les îlots O (Caprioli *et al.*, 2005). Les EHEC O157 se distinguent des autres *E. coli*, notamment, par le fait qu'ils produisent plusieurs toxines Stx, qu'ils ne fermentent pas le sorbitol et qu'ils n'expriment pas d'activité β -glucuronidase. Le gène qui code pour cette dernière activité, *uidA*, est susceptible de subir des mutations.

Grâce à des techniques moléculaires, on a comparé ces différentes caractéristiques génotypiques et phénotypiques chez plusieurs souches EHEC O157 et d'autres souches apparentées. En se basant sur ces propriétés, on a pu reconstituer le puzzle jusqu'à un ancêtre commun et déduire les différentes étapes ayant conduit à l'EHEC O157 et aux autres souches apparentées.

Un modèle concernant l'émergence du clone O157:H7 a été proposé par Feng et collaborateurs (1998) sur base des événements qui seraient intervenus à partir d'un ancêtre génétiquement le plus proche des O157:H7, l'EPEC O55:H7 β -glucuronidase et sorbitol positifs (GUD+, SOR+) (figure 6).

Le modèle commence avec une souche EPEC-like, capable de fermenter le sorbitol (SOR+) et d'exprimer une activité β -glucuronidase (GUD+), comme la plupart des *E. coli* actuels. À partir de là, cette souche a acquis les gènes codant l'antigène somatique O55 et pour l'antigène flagellaire H7. L'îlot de pathogénicité LEE contenant, entre autres, les gènes codant pour l'intimine apparaît à ce stade (McDaniel *et al.*, 1995). Le LEE peut être loca-

lisé au niveau de différents sites dans le chromosome bactérien.

L'étape suivante a été l'acquisition du gène *stx2* qui code pour la toxine Stx2, probablement par transduction avec un bactériophage, il en résulte l'émergence du clone O55:H7 *stx2*.

Deux changements sont ensuite apparus, l'acquisition du plasmide EHEC codant les hémolysines et l'acquisition de la région *rfb* nécessaire à la synthèse de l'antigène O157 modifiant l'antigène O55 en O157. Cette région code pour l'antigène somatique O157 ainsi que pour un système de sécrétion de type III (Levine *et al.*, 1987 ; Tarr *et al.*, 2000).

C'est à cette étape que la souche acquiert une mutation silencieuse en position +93 du gène *uidA*. On a donc à ce stade, une souche EHEC O157 productrice de Stx2, mais SOR+, GUD+.

À partir de cette souche, deux lignées d'évolution existent. L'une va perdre sa mobilité, mais garder son activité SOR+ et GUD+ (souche O157:H- responsable de SHU, isolée en Allemagne (Karch *et al.*, 1993)), alors que l'autre perd sa capacité à fermenter le sorbitol et acquiert le gène de *stx1* grâce à un bactériophage. L'étape finale sera la perte de l'activité β -glucuronidase (par mutation de *uidA*) (Monday *et al.*, 2001) et engendrera le prototype EHEC O157 producteur de Stx1 et/ou Stx2, SOR- et GUD-.

6.1.2. Relations clonales entre les souches O157:H7

Les études de clonalité réalisées sur les souches de sérotype O157:H7 suggèrent la répartition mondiale d'un seul clone, très conservé (Allison, 2000). Cependant, Baker et collaborateurs (1997) suggèrent qu'aux Etats-unis, deux clones existaient : un associé au réservoir bovin moins transmis et moins pathogène pour l'homme et un deuxième retrouvé fréquemment en situation pathogène chez l'homme.

6.1.3. Relations clonales entre les STEC non O157

Les souches pathogènes de même sérotype isolées dans différents pays à plusieurs années d'intervalle sont génétiquement proches et appartiennent à un même clone.

Par contre, des différences impor-

tales existeraient entre les souches de sérotypes différents. Les STEC O26, O103:H2, O111:H-, O157:H7 appartiennent à des lignées différentes qui auraient émergé indépendamment les unes des autres. Certaines de ces lignées pourraient être particulièrement aptes à subir des événements de transferts horizontaux, comme cela a été montré pour O91:H21 (Pradel, 2002 ; Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003).

6.2. Épidémiologie chez l'homme

Toute personne est potentiellement sujette au risque et peut développer une diarrhée si elle ingère des STEC. Cependant, les jeunes enfants de moins de 5 ans, les personnes âgées de plus de 65 ans ou les personnes ayant pris un traitement antibiotique récemment sont plus susceptibles de développer la maladie (Griffin *et al.*, 1990).

6.2.1. Sérogroupes incriminés

Les sérotypes le plus incriminés lors d'infections sporadiques ou d'épidémies sont les sérotypes O157:H7 et O157 non mobiles ou H-. En 1984, le sérotype O145:H- a été impliqué lors d'une épidémie affectant plus de 100 enfants au Japon. Il a été ensuite isolé chez les bovins aux Etats-Unis, Canada puis en Europe (Johnson *et al.*, 1996). Plus de 200 autres sérogroupes sont aussi mis en cause dans la survenue d'infections à EHEC et leur fréquence ne cesse d'augmenter. Parmi les plus fréquemment isolés chez les patients citons les sérogroupes : O26, O103, O111 et O145. De nouveaux clones dont O118:H16 et O121:H19 ont récemment été isolés dans des cas d'infections humaines (Beutin *et al.*, 2004).

Notons que la recherche des STEC est souvent limitée au seul sérotype *E. coli* O157:H7 (SOR-; GUD-) dont le biotype est particulier et pour lequel il existe des méthodes de détection validées à l'échelon international. Néanmoins, des cas de SHU ont été également associés à des souches STEC O157:H- (SOR+ GUD+). Les STEC O157:H- fermentant le sorbitol ont été impliqués pour la première fois en 1988 lors d'une épidémie de SHU affectant des enfants d'Allemagne. Ce nouveau phénotype est à l'origine de la majorité des cas de SHU en pédiatrie dans cette région d'Allemagne

(Gunzer *et al.*, 1992). Ce pathotype possède en commun avec les STEC O157 sorbitol négatifs le plasmide de 90 kb, les phages de conversion pour *stx2* et le gène *eae*.

6.2.2 Incidence des infections humaines aux STEC

L'incidence des cas d'infections humaines à STEC varie considérablement d'un continent à un autre et d'une région à une autre. Dans les pays les plus touchés (Etats-Unis, Canada, Ecosse, Angleterre, Allemagne, Suède, Argentine et Japon), l'incidence annuelle de ces infections peut être supérieure à 8 pour 100.000 habitants (Mead et Griffin, 1998).

En 2004, 2771, 795 et 702 cas d'infections à STEC ont été respectivement enregistrés au Japon, en Allemagne et en Angleterre et Pays de Galles (European Food Safety Authority, 2004).

Le tableau II présente une liste non exhaustive des principales épidémies humaines dues à STEC.

Aux USA, de 1982 à 2002, 350 épidémies responsables de 8.598 cas dont 1.493 hospitalisations (17 %), 354 cas de SHU (syndrome hémolytique urémique) (4 %) et 40 décès (0,5 %) furent rapportés dans 49 états. Les aliments ont été impliqués dans 52 % des épidémies, l'eau dans 9 %, la contamination interhumaine dans 14 %. Le contact avec un animal contaminé dans 3 % et 0,3 % ont eu pour cause une contamination de laboratoire. La viande hachée de bœuf a été responsable de la majorité des épidémies (41 % des épidémies d'origine alimentaire) (Rangel *et al.*, 2005).

Les plus importantes épidémies remontent à la fin de l'année 1992 et en début de 1993 lorsque quatre états de l'Ouest firent l'expérience d'une sévère épidémie liée à des hamburgers mal cuits contaminés provenant d'une même chaîne de restauration rapide. Plus de 700 personnes dans quatre états différents (Washington, Idaho, Californie, Nevada) furent infectées. Il y eut 51 cas de SHU et quatre morts. Depuis cette vague épidémique, l'incidence des infections à EHEC O157 n'a pas cessé d'augmenter jusqu'en 2000 (626 cas d'infections à STEC O157 et 57 cas à STEC non O157). À partir de cette année là, une légère diminution du nombre de cas a pu être observée : en 2001 (560 cas à STEC O157 et 61

à STEC non O157), en 2002 (638 cas à STEC O157 et 35 cas de STEC non O157) et en 2003 (444 cas à STEC O157 et 4 à STEC non O157) (Center for Disease Control, 2004).

Aux Etats-Unis, la fréquence estimée des infections liées aux EHEC non-O157 est aussi importante que celles dues au sérotype O157. Les STEC non-O157 causent environ 37.000 cas d'infections annuellement. Les sérotypes O26, O111 et O103 sont prédominants. STEC O111 est considéré comme le deuxième agent responsable des cas de SHU après STEC O157:H7 (Brooks *et al.*, 2005).

Une forte prévalence d'infections à STEC O157 (5 fois plus élevée qu'en Amérique du Nord) est enregistrée dans les régions de l'Amérique du Sud et spécialement en Argentine où le SHU est endémique (Mead et Griffin, 1998). En moyenne, 300 nouveaux cas et une incidence de 9,2 pour 100.000 habitants (enfants de moins de cinq ans) sont reportés annuellement en Argentine.

Dans les deux hémisphères, les infections surviennent plus fréquemment en été qu'en hiver.

Deux mille trois cent vingt neuf cas d'infections à STEC ont été enregistrés dans 18 pays d'Europe en 2004 au lieu de 2.026 en 2000, soit une augmentation d'environ 15 % de cas enregistrés. Une prédominance du sérotype O157 a été particulièrement constatée dans la majorité des pays d'Europe non continentale (Irlande, Royaume-Uni) tandis que dans certains pays d'Europe continentale comme le Danemark, l'Italie, l'Allemagne, le Grand-Duché du Luxembourg et la Slovaquie, les STEC non O157 sont plus importants. Les systèmes de surveillance n'étant pas les mêmes dans tous les pays, il est difficile de comparer les différentes données néanmoins le nombre de cas d'infections enregistrés en 2004 est élevé en Ecosse (214), en Suède (200), en Angleterre (702) et au Danemark (168) (European Food Safety Authority, 2004).

L'Ecosse est le pays européen qui a connu les deux plus grandes épidémies à STEC O157 : plus de 100 personnes dont 69 cas confirmés par le laboratoire et un décès ont été rapportés suite à une contamination à partir de lait cru en 1994. Lors de la deuxième épidémie, survenue en 1996, 500 personnes ont été malades, 272 cas ont été confirmés par le laboratoire et 20

personnes sont décédées. La consommation de viande contaminée provenant d'une même boucherie a été la cause de l'épidémie (Cowden *et al.*, 1997). En 2000, l'Ecosse a enregistré 5 épidémies (deux d'origine alimentaire) affectant plus de 31 personnes en 2000, 10 épidémies en 2001 et plus de 44 personnes atteintes.

L'Angleterre et le Pays de Galles ont aussi enregistré un plus grand nombre de cas d'infections à STEC pendant les années 1999 et 2000 (17 cas d'infections à STEC par million d'habitants en Angleterre, 751 cas cliniques confirmés de SHU et 16 épidémies en 2001). Quatre des épidémies enregistrées en 2001 ont impliqué, comme source de contamination, les matières fécales de lapins sauvages. L'année suivante (2002), la présence de STECO157 dans les matières fécales d'oiseaux ont été à l'origine d'une épidémie en Grande-Bretagne (European Commission – Health and Consumer Protection Directorate, 2002).

En Suède, le nombre de cas d'infections à STEC a varié entre 69 et 96 cas entre 1998 et 2001. La Suède a enregistré trois épidémies à STEC O157, une en 2000 affectant trois personnes qui ont été exposées aux animaux dans une ferme, deux autres en 2002 impliquant pour l'une l'eau de mer et pour l'autre des saucisses fumées de fabrication artisanale (European Commission – Health and Consumer Protection Directorate, 2002).

En Allemagne, l'incidence des cas d'infections à STEC est importante : 795 cas STEC ont été enregistrés en 2004. L'Allemagne a connu deux épidémies en 2002 impliquant particulièrement des STEC O157 non mobiles, fermentant le sorbitol (European Commission – Health and Consumer Protection Directorate, 2002).

En France, aucune épidémie à STEC n'a été identifiée jusqu'en 1992, date à laquelle des cas de SHU ont été décrits chez quatre personnes ayant consommé du lait cru de vache et de chèvre. L'agent causal n'a pas été identifié. Depuis, plusieurs épidémies à STEC ont été rapportées dont une à STEC O148 en 2001 à partir de couscous avec merguez (10 cas, 1 SHU et 0 décès), une en 2002 à STEC O148:H8 à partir de viande de mouton (11 cas; deux SHU et 0 décès) (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003) et une épidémie en 2004 à partir de fromage

Tableau II. Prévalence et distribution du portage des STEC O157 par les bovins à travers le monde.*(Modifié de Hussein et Bollinger, 2005). Les prévalences sont indiquées par ordre croissant.*

| Pays | Année | Période | Prévalence en % (nombre de +/-nombre testé) |
|---------------------------|------------|-------------------|--|
| Australie | 2002 | Non précisé | 0,2 (3/1692) |
| Norvège | 1998 -1999 | Décembre-Janvier | 0,2 (3/1541) |
| Kansas | 2000 | Décembre-janvier | 0,3 (44/17050) |
| Washington | 1994 | Décembre-Janvier | 0,3 (2/600) |
| Canada | 1994 | Décembre-janvier | 0,4 (4/1000) |
| Washington | 1994 | Décembre-Janvier | 0,7 (10/1412) |
| Pologne | 1999 | Décembre-Janvier | 0,7 (4/551) |
| USA (Kansas et Nebraska) | 1999-2000 | Septembre-Octobre | 0,9 (82/9122) |
| Royaume Uni | 1987 | non précisé | 1 (2/227) |
| USA (Nevada) | 1999 | Décembre-Avril | 1,2(1/86) |
| USA (Nevada) | 1999-2000 | Janvier-Septembre | 1,2 (1/82) |
| Royaume Uni | 1994 -1995 | Juin-Juin | 1,2 (5/423) |
| Canada et MidwesternUS | 1997 | Avril-Mars | 1,2 (1/85) |
| Brésil | 1996 -1997 | Septembre-Avril | 1,3 (1/76) |
| Finlande | 1997 | Décembre-Juin | 1,3 (19/1448) |
| Dakota | 2003 | Novembre-Octobre | 1,4 (2/144) |
| Canada et MidwesternUS | 1996 | Avril-Mars | 1,5 (1/67) |
| Suisse | 2002 -2003 | Juin-Janvier | 1,6 (47/222930) |
| Corée | 2000-2002 | Juillet-Avril | 1,7 (15/864) |
| Japon | 1992-1994 | Non précisé | 1,8 (7/387) |
| Irlande | 1998-1999 | Mai-Juin | 2,4 (6/250) |
| Italie | 1995 | Juillet-Fevrier | 3,6 (15/419) |
| Idaho, Washington, Oregon | 1997 | Novembre-Juillet | 3,6 (38/1046) |
| Japon | 1998-1999 | Juillet-Novembre | 4 (5/125) |
| Turquie | 2000-2001 | Avril-Janvier | 4,2 (14/330) |
| Norvège | 1991-1995 | Non précisé | 4,6 (23/504) |
| Royaume Uni | 1999-2000 | Janvier - Janvier | 4,7 (186/3939) |
| Midwestern US | 2001-2002 | Fevrier-Avril | 5,9 (70/1189) |
| Canada et MWUS | 1996 | Avril-Mars | 6 (4/67) |
| Hollande | 1995-1996 | Novembre-Juin | 6,3 (59/937) |
| Belgique | 1998-1999 | Juillet-Juin | 6,3 (81/1281) |
| Argentine | 2000 | Octobre-Avril | 6,8 (4/59) |
| Nord du Dakota | 2003 | Novembre-Octobre | 6,9 (10/144) |
| Kansas | 1997 | Octobre-Novembre | 6,9 (61/878) |
| Ecosse | 2002 | Mai-Juillet | 7,5 (44/589) |
| Royaume Uni | 1997-1998 | Mars-Avril | 12,9 (620/4800) |
| Canada Mid | 1996 | Avril-Mars | 13,2 (5/3) |
| USA | 2000 | Avril-Mai | 13,3 (636/4790) |
| Canada Mid | 1997 | Mars-Avril | 14,1 (12/85) |
| Canada Mid | 1996 | Mars-Avril | 15,8 (6/38) |
| UK, Irlande | 1998-1999 | Janvier-Avril | 17 (17/100) |
| CanadaMid | 1997 | Avril-Mars | 18,7 (9/48) |
| Tchéquie | 1997-1998 | Septembre-Octobre | 19,7 (72/365) |
| Japon | 1997-1998 | non précisé | 27,3 (6/22) |
| Canada, MD | 1997 | Avril-Mars | 27,3 (13/48) |
| MidwesternStates | 1999 | Juillet-Aout | 27,8 (91/327) |

de chèvre contaminé (European Food Safety Authority, 2006). Deux importantes épidémies ont été signalées en France en 2005. Au cours de la première, 69 personnes dont 57 enfants ont été victimes d'une contamination à STECO157 à partir de steak haché surgelé. Seize enfants ont présenté un SHU, 7 ont été dialysés, aucun décès n'a été enregistré. La deuxième épi-

démie a impliqué un fromage « type camembert » au lait cru contaminé par STEC de sérotype O26. L'Institut de Veille sanitaire a fait état de cas de SHU chez 6 enfants dans le nord de la France. Les fromages furent très vite retirés du commerce (Institut de Veille sanitaire, 2006).

En France, du fait de l'absence de surveillance épidémiologique des

infections gastro-intestinales à STEC intégrant ou non des colites hémorragiques, la répartition des sérogroupes n'est connue que dans le cadre de SHU d'enfants de moins de 15 ans. Il apparaît une forte proportion (45 %) du séro groupe O157 sur la période 1996-2003 (Espié *et al.*, 2004).

Les autres sérogroupes impliqués dans des cas de SHU depuis 2002 sont les

sérotypes O145, O91, O17, O26, O103, O128, O111 (Espié *et al.*, 2004).

En Belgique, deux petites épidémies à STEC O157 ont été signalées. La première en 2001 due à l'ingestion de filet américain provenant du même boucher et impliquant au moins 5 personnes (Ducoffre, 2003). La seconde en 2004, dans une institution psychiatrique, a donné lieu à 4 cas de SHU et à l'identification d'un porteur au sein du personnel de cuisine (Ducoffre, 2005).

Le Danemark a enregistré les premières épidémies en 2004. Le sérotype STEC O157 a été impliqué dans la plus importante, affectant plus de 25 personnes contaminées à partir de produits laitiers. Le contact d'enfants avec des animaux de ferme excréteurs a été également une des causes des épidémies (European Food Safety Authority, 2006).

En Italie, le nombre de cas d'infections à STEC a été de 24 cas en 2004. Les STEC non O157 et particulièrement le sérotype O26 a été responsable de la majorité des cas (40 %) des infections.

En 2004, une épidémie a été enregistrée suite à la consommation de saucisse fabriquée à partir de viande de porc (European Food Safety Authority, 2006).

En Australie, la première épidémie date de 1995 suite à la contamination de saucisses sèches fermentées par des STEC O111:H-. Vingt-trois cas de SHU et un décès ont été signalés lors de cette épidémie (Center for Disease Control, 1995).

Au Japon, une importante épidémie est survenue en juillet 1996 dans la ville de Sakai où 5.727 personnes furent contaminées par des germes de radis blancs dans une cantine scolaire.

Dans ce pays, le nombre de cas a varié de 100 à 1250 puis s'est élevé à 2771 cas entre 1994, 2000 et 2004 (Michino *et al.*, 1999 ; European Food Safety Authority, 2004).

En Irak, une étude rapporte une prévalence de 11,5 % d'EHEC O157:H7 dans les selles de 200 enfants atteints de diarrhées hémorragiques (Shehib *et al.*, 2003).

En Afrique, très peu de données sont disponibles. La première épidémie de diarrhée hémorragique est survenue en Afrique du Sud en novembre 1992. STEC O157 non mobile a été retrouvé

dans l'eau et dans la viande de bœuf (probablement à l'origine de la contamination) (Effler *et al.*, 2001).

Entre novembre 1997 et le 20 avril 1998, 298 personnes ont été atteintes de diarrhées sanglantes au Cameroun. Les analyses de laboratoire réalisés pendant l'épidémie (taux de létalité de 16,4 %) ont montré une amibiase chez un patient sur trois et trois types de bactéries pathogènes : *Shigella dysenteriae* multirésistante de type 1, *S. boydii* et *Escherichia coli* entéro-hémorragique (Cunin *et al.*, 1999).

6.3 Modes de transmission

Les trois voies principales d'infection sont (i) l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, (ii) la transmission de personne à personne et (iii) le contact direct avec les animaux et/ou l'environnement des fermes.

6.3.1. Transmission alimentaire

La majorité des infections est due à l'ingestion d'aliments contaminés. La viande de bœuf constitue la principale source de contamination suite à une cuisson insuffisante qui ne permet pas d'atteindre à cœur une température suffisante pour éliminer les bactéries pathogènes (Roberts *et al.*, 1995). Les résultats de plusieurs enquêtes ont montré que les viandes de bœuf crues ou insuffisamment cuites, les viandes hachées (Paton *et al.*, 1996), le lait non pasteurisé et les produits laitiers (fromage au lait cru, fromage frais), les produits fermentés (saucisse sèche fermentée), le cidre, l'eau de boisson, la consommation d'eau contaminée (eaux de puit, eaux de source privée, eaux de distribution non traitées) (Jones and Roworth, 1996), les légumes crus comme les germes de luzerne aux Etats-Unis (Breuer *et al.*, 2001) et les pousses de radis ont été impliqués dans des cas d'infections à STEC (Michino *et al.*, 1999).

L'hypothèse d'une contamination croisée avec des aliments contaminés ou lors de l'utilisation d'ustensiles souillés a été avancée. C'est le cas d'ouvriers au Royaume-Uni qui se seraient infectés lors de la manipulation de légumes crus contaminés. Toutefois, ces légumes n'ont pas transmis directement la maladie aux personnes qui les avaient consommés (Morgan *et al.*, 1988).

6.3.2. Transmission inter-humaine

La transmission inter-humaine dans la famille ou dans la collectivité est considérée comme un facteur de risque de survenue des infections à STEC notamment chez les enfants de moins de 15 ans. Des cas de transmission de personne à personne, par contact rapproché avec une ou des personnes ayant eu de la diarrhée, ont été observés en milieu familial (Vaillant et Espié, 2003). Cette transmission est d'autant plus importante que l'hygiène générale et plus particulièrement celle des mains est insuffisante et que les contacts sont étroits. De ce fait, la contamination féco-orale est une réelle préoccupation dans les crèches ou les divers centres de soins (hôpitaux, maisons de retraites) (Belongia *et al.*, 1993).

6.3.3. Transmission par contact direct avec les animaux

La transmission d'infections à *E. coli* O157 à l'homme, par contact direct ou indirect avec des animaux de ferme ou leur déjections a été décrite lors d'investigations de cas isolés (Heuvelink *et al.*, 2002) et lors d'épidémies (Crump *et al.*, 2002).

Durant l'été 2000, 56 personnes malades et 19 hospitalisées ont été contaminées après contact avec des animaux porteurs lors de sorties dans les fermes pédagogiques en Pennsylvanie et à Washington. Les fermes pédagogiques, les parcs zoologiques et aires d'attraction abritant des animaux porteurs de STEC sont des facteurs de risque importants pour les infections à STEC. Ils ont été à l'origine de nombreuses épidémies en Angleterre, au Canada, et aux Etats-Unis dans les années 1999 à 2000. À cet effet, des guides et des recommandations sont préconisés pour prévenir les cas d'infections dans ces pays (Center for Disease Control, 2001). Cependant, des cas de portage sain ont été décrits chez des personnes en contact avec un réservoir animal excréteur de STEC. Une étude, portant sur des familles vivant dans des fermes produisant du lait, a montré que 6,3 % des membres des différentes familles excrétaient des STEC dans leurs matières fécales (Wilson *et al.*, 1996) et 12 % des membres avaient des anticorps dirigés contre le LPS de *E. coli* O157. Aucune maladie ne s'est déclarée chez les résidents des différentes fermes, ce qui

pourrait témoigner d'une protection induite par une immunité digestive.

6.3.4. Autres modes de transmission

Des cas de contaminations de laboratoire ont été décrits dans la littérature (Burnens *et al.*, 1993). Actuellement, il est recommandé de manipuler les STEC O157 en laboratoire d'un niveau de sécurité suffisant (P3) afin d'éviter toute contamination du personnel ou de l'environnement (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003).

6.4. Épidémiologie environnementale

6.4.1. Portage par les animaux d'élevage

Le tractus digestif des ruminants et spécialement des bovins est un important réservoir des *E. coli* O157. Ils ont été également isolés chez les ovins, les caprins, les zébus, les daims, les porcins, les animaux de compagnie, les mouettes et les pigeons. D'autres sérotypes pathogènes pour l'homme tels : O26:H11; O103:H2; O11:NM; O113:H21 ont été isolés des matières fécales d'ovins, de veaux et de bovins (Caprioli *et al.*, 2005).

Portage par les bovins

Depuis l'apparition des séries d'épidémies à STEC O157 impliquant le plus souvent l'espèce bovine et ses sous-produits, de nombreuses enquêtes ont été menées afin de définir si le portage par ces animaux pouvait être une source de contamination des aliments. L'éventail des aliments incriminés dans des cas d'épidémies est large, mais il semblerait que la principale origine soit la contamination par les matières fécales des bovins. C'est pourquoi la grande majorité des études effectuées concerne les ruminants, et notamment les bovins, considérés comme le réservoir principal de STEC (Whipp *et al.*, 1994).

Chez le bovin adulte en bonne santé, plus de 200 sérotypes STEC en combinaison avec différents sérogroupes H ont été isolés. Plus d'une centaine ont été retrouvés chez l'homme. Un ou plusieurs types peuvent être retrouvés chez un même animal. Les STEC peuvent persister pendant plusieurs années dans le même troupeau ce qui prouve encore une fois le rôle important des bovins comme réservoirs des

STEC. La prévalence des STEC chez les bovins varie en général de 0,1 à 63 % et de 0,3 à 87 % au niveau des troupeaux (Mainil et Daube, 2005).

Chez les bovins de boucherie, la prévalence semble être plus élevée chez les animaux qui vivent en pâturage. Ces derniers contaminés par les matières fécales favorisent la transmission des STEC à d'autres animaux et propagent les STEC au niveau de l'environnement. La prévalence est également élevée chez les animaux nourris à base de céréales et chez ceux qui sont soumis à l'engraissement. Ces derniers hébergent une large variété de sérotypes avec une prédominance pour le sérotype O157.

La prévalence varie de 0,3 à 19,7 % chez les bovins de boucherie à l'engraissement de 0,7 à 27,3 % chez les animaux mis en pâturage et de 0,3 à 6,9 % pour les autres bovins à la ferme.

Les tests effectués au niveau des abattoirs chez les bovins ont montré un taux de prévalence des STEC O157 variant de 0,2 % à 27,8 % (Hussein et Bollinger, 2005).

La prévalence des STEC non O157 varie en général de 2,1 % à 70,1 %. Elle varie de 4,6 % à 55,9 % chez les animaux mis à l'engraissement et de 4,7 % à 44,8 % chez les bovins au pâturage.

La prévalence des STEC non O157 chez les bovins de boucherie est élevée à tous les stades et dans tous les systèmes de production. Environ 250 sérotypes ont été isolés dont 42 sont potentiellement pathogènes pour l'homme (Hussein et Bollinger, 2005).

D'importantes variations (tableau II) sont enregistrées au niveau des prévalences. Elles varient en fonction de l'âge, du sexe de l'animal, du stade de production, des saisons (plus élevées durant les mois chauds), de l'alimentation, de l'environnement et des différentes pratiques au niveau des systèmes de management des élevages (densité des animaux, type d'élevage).

Chez les vaches laitières, les prévalences des STEC O157 présentent aussi des variations importantes. Elles varient de 0,4 % à 48,8 % (Hussein et Bollinger, 2005). Elles sont de 0,5 % au Canada (Clarke *et al.*, 1994) à 16,1 % au Royaume-Uni (Chapman *et al.*, 1997). Elle est de 1 à 2 % chez les jeunes vaches laitières (Chapman *et al.*, 1993). Ces dernières présentent

un facteur de risque important pour la santé publique puisque la viande de ces animaux est souvent orientée vers la transformation en viande hachée.

La prévalence des STEC non O157 varie chez les bovins laitiers entre 0,4 % à 52,0 % chez les vaches, de 1,7 à 74,0 % chez les génisses et de 1,3 à 68,7 % chez les veaux (Hussein et Bollinger, 2005). Pour les STEC non O157, la prévalence semble être plus élevée chez les adultes que chez les plus jeunes animaux (Garber *et al.*, 1999).

Le portage des STEC O157 par les bovins est le plus important durant les mois chauds (juin à octobre) et inversement, le moins élevé en hiver (novembre et décembre). Les données concernant les STEC responsables de diarrhée chez le veau sont rares. Ils appartiennent aux sérotypes O8:H8 ; O20:H19 ; O113:H21. Ce dernier O113:H21 a été impliqué dans des cas de SHU chez l'homme (Mainil et Daube, 2005)

Conditions de survie des STEC dans les matières fécales de bovins

L'excrétion des STEC par les bovins est intermittente et fluctue en fonction de la durée de l'engraissement et en fonction des saisons (Hussein et Bollinger, 2005) (tableau II).

Le nombre de STEC O157 est de l'ordre de 10^2 à 10^5 ufc (unités formant colonies) par gramme de matières fécales (Caprioli *et al.*, 2005). Dans une étude au Japon, il a été de l'ordre de 10^4 ufc/g et a persisté chez un animal pendant 10 semaines pour les STEC O157 et de 10^2 ufc/g pendant trois semaines pour le sérotype O26. Les souches isolées des fèces de bovins après plusieurs jours de stockage peuvent conserver leur capacité de virulence et produire leurs toxines Stx1 et Stx2 après 49 jours à 37°C, 56 jours à 22°C et 70 jours à +5°C (Wang *et al.*, 1996).

Influence des conditions d'élevage sur la survie et la résistance des STEC

Des *E. coli* présents à une dose de l'ordre de 9×10^8 ufc/g dans un mélange « sédiments et fèces » ont survécu pendant au moins 245 jours dans un réservoir d'eau pour animaux (Hancock *et al.*, 2001 ; Lejeune *et al.*, 2001). Ces auteurs ont montré que les souches d'*E. coli* ayant pu survi-

vre pendant ces mois étaient toujours infectieuses pour des veaux âgés de 10 semaines qui, par la suite, excrétaient eux-mêmes des *E. coli* O157. Les souches qui ont été isolées et caractérisées chez ces animaux pendant au moins 8 mois sont identiques à la souche initiale.

L'eau des abreuvoirs contaminée par un animal excréteur représente elle aussi une source de contamination et de transmission de ces germes d'un animal à un autre.

Le type de régime alimentaire auquel sont soumis les animaux peut influencer la survie et la persistance des STEC. On note une plus grande résistance chez les animaux nourris aux céréales par opposition à ceux qui ont une alimentation fourragère. En Suède, d'autres études ont montré que les animaux qui étaient gardés à l'étable pendant l'été, consommant un aliment concentré à base de céréales, continuaient à excréter la bactérie contrairement à ceux qui avaient été mis au pré et qui consommaient de l'herbe. L'alimentation à base de céréales, entraînant une acidification du contenu digestif, pourrait favoriser l'excrétion d'*E. coli* O157:H7. Au contraire, d'autres auteurs ne montrent pas dans leurs résultats des différences d'excrétion entre les bovins nourris avec du foin ou avec des céréales. La contamination de l'herbe par des fèces d'animaux couplée à de mauvaises conditions d'ensilage peut favoriser la persistance et le développement des STEC O157 chez les ruminants (Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments, 2003)

6.4.2. Portage par d'autres espèces de ruminants

Le portage fécal de STEC chez les moutons et les chèvres a fait l'objet de nombreux travaux. Des chiffres élevés de contamination ont été rapportés par différents auteurs, entre 63 % et 66,6 % chez les moutons et entre 45 % et 56,1 % chez les chèvres (Beutin *et al.*, 1993 ; Randall *et al.*, 1997). D'une manière générale, le sérotype O157:H7 a rarement été détecté lors de ces études, les sérotypes les plus fréquemment isolés sont les sérotypes : O9:NM, O128:H2 et O146:H21 (Zhang *et al.*, 2002 a).

En 2001, une étude portant ainsi sur 1.623 fèces d'ovins a révélé la présence de STEC chez 85 % des agneaux et 95 % des moutons testés (Djordjevic

et al., 2001). Parmi les souches isolées, 47,5 % des STEC possédaient les gènes *stx1*, *stx2* et *ehxA*.

Les ovins australiens semblent être porteurs de souches STEC possédant le variant *stx2d* (Ramachandran *et al.*, 2001).

Les buffles, les ruminants sauvages, les daims et autres gibiers sont également de potentiels réservoirs pour ce groupe de pathogènes. Le portage des STEC par ces animaux sauvages favorise la propagation et la dissémination de ces germes dans l'environnement.

6.4.3. Le portage des STEC par des animaux domestiques

Les STEC O157 ont été isolés chez des animaux domestiques comme les chevaux, les chiens, les lapins domestiques, les lièvres. Il n'est pas encore bien établi si ces animaux sont des hôtes réels ou de simples vecteurs (contaminés après contact) pour ces microorganismes.

Les porcs ne sont pas considérés comme des réservoirs potentiels des STEC pathogènes pour l'homme. Le portage fécal des porcs testés au niveau des abattoirs varie de 0,2 % à 2 % en Europe, Japon et aux Etats-Unis et de 8 à 10 % en Amérique du Sud (Caprioli *et al.*, 2005).

6.4.4. Le portage chez les oiseaux

Enfin, il existe très peu d'études permettant de préciser la prévalence des STEC dans les élevages de volailles. Le portage est probablement fécal, le taux de contamination des fèces varie de 0 % en Allemagne (Beutin *et al.*, 1993) à 9,6 % en Slovaquie (Pilipincin *et al.*, 1999). Cette dernière étude a révélé la présence d'*E. coli* O157:H7 producteurs de toxines Stx1 et Stx2. Ces pathogènes ont été isolés dans les sous-produits de volailles et dans le contenu intestinal de dindes.

D'autres études expérimentales ont montré que les STEC colonisent parfaitement le cæcum de poussins pendant de longues périodes (Beery *et al.*, 1985 ; Caprioli *et al.*, 2005). Le pigeon semble être un réservoir de souches STEC possédant le variant *stx2f* (Morabito, 2001).

6.4.5. L'environnement

L'environnement peut devenir une véritable niche écologique pour les STEC. Les STEC ont la capacité de résister

dans le fumier. En 1992, dans le Maine, aux Etats-Unis, une infection par STEC O157:H7 a été décrite chez un patient qui avait consommé les produits de son jardin fertilisé avec du fumier de bovins présentant une sérologie positive pour *E. coli* O157. D'autres cas similaires d'infections ont été décrits à partir de pommes de terre fertilisées avec du fumier de bovins (Chapman *et al.*, 1997).

Au niveau du sol, des facteurs tels que la température, le degré d'humidité, la flore de compétition ou le *ratio* sol/fumure semblent jouer un rôle dans la survie d'*E. coli* O157:H7. La population STEC O157 a persisté pendant 231 jours à 21°C à humidité constante après une contamination artificielle du sol. Les STEC persistent plus longtemps lorsque le *ratio* fumure/sol est de 1/25 à 1/100 que lorsqu'il est de 1/10. La présence d'une flore compétitive réduirait le nombre de ces pathogènes présents sur le sol.

La nature ou le type de sol aurait une influence sur la survie de ces pathogènes. Elle est beaucoup plus longue pour les sols argileux et de terreau que pour les sols sablonneux. La bactérie peut encore être isolée après 25 et 41 jours après son dépôt sur un sol en jachère, mais jusqu'à 92 et 96 jours après son dépôt sur un sol après fauchage d'une récolte de luzerne ou de seigle.

E. coli O157:H7 est très résistant dans l'environnement. Un délai de 3 semaines entre la présence d'animaux d'élevage sur un terrain et son usage pour diverses activités de loisir semble insuffisant pour éviter le risque de contamination des humains par des souches de *E. coli* O157:H7 (Brown *et al.*, 2002). L'eau de ruissellement, le niveau de précipitations des pluies et les eaux usées contaminées augmentent le risque de pollution de l'eau au niveau des sols et de l'environnement. Les boues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines ayant subi des traitements (chaulage, séchage en lit ou en silo, compostage) réduiraient l'introduction de STEC dans l'environnement (Vernozy-Rozand *et al.*, 2002).

7. L'EVALUATION DU RISQUE LIÉ AUX *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTEURS DE SHIGATOXINES (STEC) O157

En plus de l'application des nouveaux standards en matière de méthodes

d'analyses et de critères microbiologiques pour STEC O157:H7 dans la viande hachée, les services d'inspection de l'USDA (*United States Department of Agriculture*) et de la FSIS (*Food Safety Inspection Service*) ont annoncé en 1998, la mise en place de plans d'évaluation des risques microbiologiques sur toute la chaîne alimentaire de l'étable à la table.

La méthodologie d'évaluation quantitative du risque microbiologique comme outil d'évaluation des risques liés aux denrées alimentaires est à l'heure actuelle en plein développement. L'évaluation du risque est une technique qui est utilisée pour estimer la probabilité d'occurrence d'un danger et la sévérité de l'effet adverse. L'ensemble est fondé sur une base de données scientifiques collectées à tous les niveaux du processus de la production à la consommation du produit. À partir d'une modélisation mathématique, elle définit le(s) paramètre(s) et le(s) niveau(x) d'intervention que l'on pourra moduler pour minimiser ou réduire le risque auquel est soumis le consommateur.

L'architecture de base pour mener une analyse du risque microbiologique lié à STEC O157 correspond à celle définie par le *Codex Alimentarius* (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999). Elle comprend quatre étapes, à savoir : (i) l'identification des dangers ; (ii) l'évaluation de l'exposition ; (iii) la caractérisation du danger et (iv) la caractérisation du risque.

7.1. Identification du danger

L'identification du danger consiste en l'identification d'un agent biologique (micro-organismes ou toxines), chimique ou physique présent dans un aliment ou dans un groupe d'aliments causant un effet adverse sur la santé humaine. STEC O157 est définitivement considéré comme un agent responsable d'infections gastro-intestinales parfois fatales chez les personnes sensibles. L'incidence croissante du nombre de cas et d'épidémies enregistrées et déclarées depuis 1982 ainsi que la sévérité des formes compliquées de la maladie justifient pleinement l'intérêt accordé à ce pathogène. La maladie est devenue à déclaration obligatoire dans de nombreux pays : aux États-Unis depuis 1994, en Suède, en Allemagne et au Danemark depuis 1998. Des plans de surveillance au

niveau des denrées alimentaires considérées à risque sont mis en place dans le monde.

La viande hachée, l'eau de boisson, les produits laitiers et autres aliments contaminés sont les principales sources de contamination pour l'homme. La transmission inter-humaine notamment dans les nurseries et les collectivités aggrave l'étendue, la propagation et la gravité des cas. La population composée d'enfants de moins de 5 ans et de personnes âgées est sensible aux formes graves des infections à EHEC O157.

STEC O157 possède la faculté de persister et de résister à différents paramètres physico-chimiques (A_w , pH, température) ce qui lui permet de survivre et de s'exprimer dans différents écosystèmes (aliment, environnement, animal, sol) lorsque les conditions lui sont optimales.

7.2. Evaluation de l'exposition

L'évaluation de l'exposition est une évaluation qualitative et/ou quantitative d'agents biologiques, chimiques et physiques dans un aliment qui correspond à l'exposition du consommateur. Cette étape doit décrire les différentes possibilités par lesquelles un agent pathogène entre dans la chaîne alimentaire au niveau de la production, de la distribution jusqu'à la consommation. En ce qui concerne STEC O157, plusieurs modèles d'évaluation quantitative du risque ont été développés notamment en ce qui concerne la production de viande hachée de bœuf considérée comme un des plus importants facteurs de risque pour STEC O157 (Duffy *et al.*, 2006). Les modèles décrivent le comportement de l'agent pathogène à travers toute la chaîne de la production jusqu'à la consommation pour estimer le niveau d'exposition. Les effets de chaque étape sur la croissance du microorganisme sont prises en compte pour quantifier deux paramètres importants : la prévalence des troupeaux et des animaux infectés ainsi que la concentration du pathogène sur toute la chaîne alimentaire jusqu'au consommateur. Tous les facteurs augmentant ou réduisant le nombre de microorganismes sont analysés (type d'animaux, influence des saisons, contamination des animaux par le cuir au cours du transport, facteurs de contamination des carcasses, du conditionnement et de la température de stockage). Lorsque

les informations à un niveau donné sont manquantes ou insuffisantes, des modèles de microbiologie prédictive ont été utilisés pour simuler la croissance ou la survie de STEC O157:H7 dans des conditions les plus proches de la réalité. Ces modèles simulent la croissance et le déclin d'*E. coli* en fonction des différents paramètres environnementaux (température, pH, activité hydrique). La simulation de Monte Carlo a permis de générer la distribution la plus représentative du risque. Des informations sur les habitudes alimentaires, la nature et le type de population sont nécessaires pour caractériser l'exposition.

7.3. La caractérisation du danger

La caractérisation du danger est une évaluation qualitative et ou quantitative de la nature de l'effet adverse en relation avec l'agent pathogène présent dans l'aliment. Cette étape caractérise la nature, la sévérité et la durée du danger. Elle doit être détaillée et toutes les variables bien documentées. La sévérité de la maladie est liée à l'interaction de trois facteurs : l'hôte, l'aliment et l'agent pathogène.

Lorsque toutes les données sont disponibles, une évaluation dose-réponse peut être menée.

L'objectif du modèle dose-réponse est de déterminer la relation entre la magnitude de l'exposition (dose) au pathogène et la sévérité de la réponse. Quatre réponses possibles sont à considérer : la probabilité de l'infection (après ingestion), la probabilité de la maladie (morbidité), la probabilité des séquelles et la probabilité de la mortalité.

La réponse est le résultat de l'interaction de différents paramètres : le microorganisme, la voie de contamination, la dose ingérée, le type de population exposée, sa sensibilité, la réponse de l'hôte, la durée et la multiplicité de l'exposition. L'ensemble des données épidémiologiques, expérimentales et leurs effets respectifs sont introduits dans des modèles mathématiques pour estimer la probabilité de l'apparition de l'infection ou de la maladie suite à l'ingestion d'une dose d'un agent pathogène. Dans ce contexte, les modèles mathématiques utilisés sont nombreux. Le modèle dose-réponse peut être une simple relation exponentielle de type beta-Poisson. Cette relation considère qu'en dessous d'une

certaine dose (seuil), aucune réponse ne sera observée et que la probabilité de survie et de croissance d'un seul microorganisme est la même, quelque soit la dose et l'agent pathogène et les caractéristiques de l'hôte. Cette relation définit un risque moyen pour la population.

D'autres études ont introduit dans leurs modèles dose-réponse, toutes les variables liées aux interactions entre le pathogène et l'hôte. Le modèle décrit par Cassin et collaborateurs (1998) considère que la probabilité d'être malade varie avec la dose ingérée et propose un modèle β -binomial modifié. Powell et collaborateurs (2000) proposent une démarche différente. Ils décrivent la loi dose-réponse pour STEC O157:H7 non par une courbe unique mais par une série de courbes. Cette série est définie d'un côté par un modèle beta-Poisson ajusté sur des données humaines associées à des *Shigella* et de l'autre côté avec un modèle beta-Poisson ajusté sur des données humaines avec des EPEC. La relation dose réponse de STEC O157:H7 doit se situer entre les deux relations dose-réponse. Ces auteurs considèrent qu'étant donné le manque de données relatives à STEC O157, il est plus raisonnable de considérer cette série de courbes que de considérer une courbe dose-réponse unique grossièrement validée par des données épidémiologiques insuffisantes.

7.4. La caractérisation du risque

La caractérisation du risque est le résultat des trois premières étapes. C'est l'étape finale de l'évaluation du risque. Toutes les variables auront été analysées pour estimer la sévérité de l'infection pour une population donnée. La réponse peut être qualitative (faible, moyenne, élevée) ou quantitative permettant une estimation du nombre de personnes atteintes.

Au niveau quantitatif, les modèles intègrent deux notions celle de l'incertitude lorsque les données sont manquantes et celle de la variabilité quand les données ne sont pas constantes.

Toutes les valeurs sont intégrées et analysées grâce à des simulations de Monte Carlo. Cette méthode permet d'obtenir à différents points une estimation complète des différentes possibilités du risque. Le moindre changement à un niveau donné nécessitera une réévaluation du risque.

En Belgique, dans le cadre d'une étude d'évaluation du risque STEC O157 dans la viande hachée de bœuf de type « filet américain » produite en Belgique, Daube et collaborateurs (1998) ont identifié les points faibles de l'étude pour lesquels certaines informations étaient manquantes et des points sensibles de contrôle au niveau des étapes de production pour réduire le risque à son minimum. L'étude a montré une insuffisance de données concernant la prévalence de STEC O157 au niveau des troupeaux, des animaux, la concentration au niveau des matières fécales des animaux et le niveau de contamination au niveau des carcasses à l'abattoir. De même, l'influence des processus de refroidissement, de préparation et de stockage sur la survie ou la multiplication de l'agent pathogène dans le filet américain n'avait pas été déterminée. En 1998, sur une population belge de plus de 10.000 individus, 250 à 500 cas d'infections intestinales (diarrhées) chez les enfants de moins de 5 ans ainsi que 42 cas de SHU dont 25 chez les enfants de moins de 5 ans et 2 cas chez les personnes âgées de plus de 65 ans ont été prédits. Le pourcentage de mortalité par an observé était d'un cas pour chacune des populations alors qu'en théorie, la mortalité est de 5 % des cas de SHU chez les enfants de moins de 5 ans et 12 % chez les plus de 65 ans (Daube *et al.*, 1998).

D'autres études d'évaluation du risque lié à STEC O157 dans les viandes hachées de bœuf ont été réalisées. Ces études ont montré pour la majorité d'entre-elles que certaines variables comme la concentration de STEC O157 dans les matières fécales des animaux destinés à l'abattoir et sur les carcasses suite à l'abattage ainsi que les températures de stockage et de cuisson sont les points essentiels sur lesquels des actions devraient être menées pour diminuer le risque. De même, les données qui sont introduites dans le modèle dose-réponse jouent un rôle important dans le résultat final et la probabilité d'être malade. Le modèle β -binomial basé sur les données de *Shigella* développé par Cassin et collaborateurs (1998) ainsi que le modèle exponentiel décrit par Nauta et collaborateurs (1999) semblent surestimer la probabilité du risque. Les estimations sont plus faibles lorsque le modèle beta-Poisson développé par Powell et collaborateurs (2000)

est utilisé. Ainsi, les auteurs s'accordent pour conclure à ce sujet qu'il est nécessaire de développer et valider les modèles mathématiques à partir de données épidémiologiques complètes et clairement documentées (Duffy *et al.*, 2006).

8. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

De cette synthèse, il ressort que les STEC sont particulièrement dangereuses pour la santé humaine causant des diarrhées et des syndromes extra-intestinaux pouvant causer la mort et que la source de contamination principale est la viande bovine mal cuite. Les bovins en bon état de santé constituent le plus important réservoir de ces pathogènes ce qui favorise la propagation dans leur environnement direct. Leur présence chez d'autres animaux est moins bien documentée mais non négligeable. D'un point de vue des facteurs de virulence, il est clair que la production de Shigatoxines est le facteur le plus important dans le mécanisme de pathogénicité car il est à la base de la sévérité de la maladie. À côté de ces toxines, d'autres éléments comme l'îlot de pathogénicité LEE jouent un rôle important dans le développement de la diarrhée. Un élément reste encore un peu obscur, il s'agit des adhésines spécifiques qui permettent la colonisation de l'hôte. Bien que plusieurs candidats aient été identifiés, la relation entre la présence de ces adhésines et la spécificité d'hôte reste encore à démontrer. D'un point de vue évolutif, si les souches du sérotype O157:H7 semblent former un groupe homogène, il n'en va pas de même pour les souches des autres sérotypes. Il semble que l'acquisition de gènes de virulence soit un processus en constante évolution et que des transferts de gènes peuvent à tout moment créer des souches potentiellement virulentes pour l'homme. D'un point de vue théorique, pour les syndromes comme le SHU ou le PTT, il semble qu'une souche possédant une adhésine spécifique de l'homme et des gènes permettant de produire les toxines Stx1 et/ou stx2 soit suffisante. Pour la diarrhée, l'acquisition du LEE semble suffisante (souche EPEC) tant chez l'homme que chez le bovin. La combinaison de ces pathotypes donnant des souches d'un degré de virulence plus important. À côté de cela,

on note que des facteurs de virulence accessoires comme ceux portés par le plasmide de haut poids moléculaire pourraient venir encore aggraver le tableau clinique. Ceci a des conséquences importantes au niveau du diagnostic. En effet, la plupart des techniques développées le sont pour les souches du sérotype O157:H7 en raison d'une part de son caractère épidémique au niveau mondial et aussi en raison de ses caractéristiques biochimiques (SOR- GUD -) qui facilite leur identification. Mais, il semble clair que ce sont toutes les souches productrices de toxines Stx qui devraient être recherchées. Si un criblage des échantillons par PCR est possible, l'isolement de la souche reste encore problématique même si des systèmes d'immunocapture pour d'autres sérotypes que O157 aient été développés. Un effort particulier doit être entrepris pour permettre l'isolement sur des milieux sélectifs de la plupart des STEC dont l'incidence est probablement sous-estimée faute de méthodes de diagnostic performantes.

Les résultats des études de prévalence, aussi bien au niveau du portage chez les animaux qu'au niveau carcasses, varient d'une région à une autre mais dans certains cas d'une étude à une autre. Les causes seraient probablement liées aux méthodes de détection utilisées mais aussi au mode d'élevage et conditions de production des animaux ce qui expliquerait en partie l'émergence de ces pathogènes dans certaines régions du globe, notamment en Amérique, Canada où les épidémies sont fréquentes. Si tous ces paramètres ne sont pas totalement maîtrisés, il est clair qu'au niveau de la prophylaxie, le meilleur moyen d'éviter les problèmes au niveau humain est de bien cuire sa viande. Mais un

soin particulier doit être apporté tout au long de la chaîne de production, au niveau de la ferme pour éviter les contaminations croisées entre les animaux et améliorer les conditions générales d'hygiène de l'exploitation. Au niveau de l'abattoir, un soin particulier doit être apporté aux étapes critiques comme l'éviscération qui est la source majeure de contamination fécale de la carcasse. L'hygiène générale doit aussi permettre de réduire les possibilités de contamination croisée entre les carcasses. Au niveau des ateliers de découpe et des étapes de transformation, des mesures de type HACCP sont de rigueur et les modèles d'évaluation du risque devraient permettre de mieux identifier les points critiques et les paramètres influençant de manière significative le développement de ces germes dans l'aliment.

Dans une dernière étape, sensibiliser la population à travers des recommandations d'hygiène générale à tous les niveaux et de bonnes pratiques de préparation des aliments à risque serait un moyen supplémentaire de prévention.

9. REMERCIEMENTS

Madame Chahed a été financée par des bourses du Ministère de l'Enseignement et de la Recherche scientifique de la République démocratique et populaire d'Algérie.

SUMMARY

Some Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are responsible for foodborne diseases

including diarrhoea but also more severe syndromes involving death in humans. They are zoonotic agents with bovine and other ruminants as the major reservoir. The major routes of transmission are usually ingestion of contaminated food (under-cooked beef products or inpasteurised milk), contaminated water, person-to-person contact and contact with animals (especially cattle) and leur environment.

The major virulence factors of Shigatoxins-producing *E. coli* are encoded by a pathogenesis island, the locus of enterocyte effacement involved in the attaching and effacing lesion formation and in diarrhoea and the Shigatoxins encoded by bacteriophages and involved in extra-intestinal syndromes. The O157:H7 serotype STEC strain is responsible for outbreaks worldwide causing thousands of ill and tens of deaths. Numerous diagnosis methods were developed to identify this pathogen from food. They include classical bacteriological, immunological and molecular methods.

Hygiene control is particularly important to avoid animal contamination in farms and meat contamination in slaughterhouse. Finally, risk assessment models have been developed in order to study the behaviour of STEC in the food chain.

BIBLIOGRAPHIE

-
- | | | |
|---|--|--|
| <p>ADU-BOBIE J., FRANKEL G., BAIN C., GONCALVES A. G., TRABULSI L. R., DOUCE G., KNOTTON S., DOUGAN G. Detection of intimins α, β, γ, and δ, Four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. <i>J. Clin. Microbiol.</i>, 1998, 36, 662-668.</p> | <p>AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS Bilan des connaissances relatives aux <i>Escherichia coli</i> producteurs de Shiga-toxines (STEC). Agence française de sécurité sanitaire des aliments : Maisons-Alfort, 2003, 220 p.</p> | <p>ALLISON L.J., CARTER, P.E., AND THOMSON-CARTER F.M. Characterization of a recurrent clonal type of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 causing major outbreaks of infection in Scotland. <i>J. Clin. Microbiol.</i>, 2000, 38, 1632-1635.</p> <p>AMMON A, PETERSEN LR, KARCH H. A large outbreak</p> |
|---|--|--|

- of hemolytic uremic syndrome caused by unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157. *J. Infect. Dis.*, 1999, **179**, 1274-1277.
- BAKER D.R., MOXLEY R.A., FRANCIS D.H. Variation in virulence in the gnotobiotic pig model of O157:H7 *Escherichia coli* strains of bovine and human origin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1997, **412**, 53-58.
- BEERY J.T., DOYLE M.P., SCHOENI J.L. Colonisation of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **49**, 310-315.
- BEGUM D., STROCKBINE N. A., SOWERS E. G., JACKSON M.P. Evaluation of a technique for identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, **31**, 3153-3156.
- BEKAL S., BROUSSEAU R., MASSON L., PREFONTAINE G., FAIRBRROTHER J., HAREL J. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 2113-2125.
- BELONGIA E.A., OSTERHOLM M.T., SOLER J.T., AMMEND D.A., BRAUNN J.E., MAC DONALD K.L. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day care facilities. *J. Am. Med. Assoc.*, 1993, **269**, 883-888.
- BENNET A.R., MACPHEE S., BETTS R.P. The isolation and detection of *Escherichia coli* O157 by use of immunomagnetic separation and immunoassay procedures. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1996, **22**, 237-243.
- BERTIN Y., BOUKHORS K., PRADEL N., LIVRELLI V., MARTIN C. *stx2* subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France : detection of a new *stx2* subtype and correlation with additional virulence factors. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 3060-3065.
- BEUTIN L., PRADA J., ZIMMERMANN S., STEPHAN R., ORSKOV I., ORSKOV F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, 1988, **267**, 576-588.
- BEUTIN L., GEIER D., STEINRUCK H., ZIMMERMANN S., SCHEUTZF. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, **31**, 2483-2488.
- BEUTIN L., ZIMMERMANN S., GLEIER K. Rapid detection and isolation of Shiga-like toxin(verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 2812-2814.
- BEUTIN L., KRAUSE G., ZIMMERMANN S., KAULFUSS S., GLEIER K. Characterization of Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 1099-1108.
- BEUTIN L., KAULFUSS S., HEROLD S., OSWALD E., SCHMIDT H. Genetic analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O103 strains by molecular typing of virulence and housekeeping genes and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 1552-1563.
- BISCHOFF C. LUTHY J., ALTWEGG M., BAGGI F. Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*, 2005, **61**, 335-341.
- BOLTON F.J., CROZIER L., WILLIAMSON J.K. Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1996, **23**, 317-321.
- BOUVET J., VERNOSY-ROZAND C. Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* vérotoxiques (STEC) et de *Escherichia coli* O157:H7 dans les aliments. *Rev. Med. Vet.*, 2000, **151**, 907-914.
- BREUER T., BENKEL D.H., SHAPIRO R.L., HALL W.N., WINNETT M.M., LINN M.J., NEIMANN J., BARRETT T.J., DIETRICH S., DOWNES F.P., TONEY D.M., PEARSON J.L., ROLKA H., SLUTSKER L., GRIFFIN P.M.A. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg. Infect. Dis.*, 2001, **7**, 977-982.
- BRIAN M.J., FROSOLONO M., MURRAY B.E., MIRANDA A., LOPEZ E.L., GOMEZ H.F., CLEARY T.G. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**, 1801-1806.
- BROOKS J.T., SOWERS E.G., WELLS J.G., GREENE K.D., GRIFFIN P.M., HOEKSTRA R.M., STROCKBINE N.A. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J. Infect. Dis.*, 2005, **192**, 1422-1429.
- BROWN M.R., SMITH A.W., BARKER J., HUMPHREY T.J., DIXON B. *E. coli* O157 persistence in the environment. *Microbiology*, 2002, **148**, 1-2.
- BRUNDER W., SCHMIDT H., KARCH H. KatP, a novel catalase peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology*, 1996, **142**, 3305-3315.
- BRUNDER W., KHANA S., HACKER J., KARCH H. Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-). *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 4447-4457.
- BURK C., DIETRICH R., ACAR G., MORAVEK M., BULTE M., MARTLBAUER E. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H19 of bovine origin. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 2106-2112.
- BURLAND V., SHAO Y., PERNA N.T., PLUNKETT G., SOFIA H.J., BLATTNER F.R. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res.*, 1998, **26**, 4196-4204.

- BURNENS A.P., ZBINDEN R., KAEMP L., HEINZER I., NICOLET J. A case of laboratory acquired infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Zentralbl. Bakteriol.*, 1993, **279**, 512-517.
- CALDERWOOD S.B., AKESON D.W.K., KEUSCH G.T., BARRET T.J., GRIFFIN P.M. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News*, 1996, **62**, 118-119.
- CAPRIOLI A., MORABITO S., BRUGERE H., OSWALD E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* : emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.*, 2005, **36**, 289-311.
- CATARAME T.M., O'HANLON K.A., DUFFY G., SHERIDAN J.J., BLAIR I.S., McDOWELL D.A. Optimization of enrichment and plating procedures for the recovery of *Escherichia coli* O111 and O26 from minced beef. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, **95**, 949-957.
- CASSIN M.H., LAMMERDING A.M., TODD E.C., ROSS W., Mc COLL R.S. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **41**, 21-44.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21. Helena, Montana. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 1994, **42**, 258-263.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections among children associated with farms visits- Pennsylvania and Washington 2001. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 2001, **50**, 293-297.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL Community outbreak of hemolytic uremic syndrome attributable to *Escherichia coli* O111:NM-South Australia 1995. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 1995, **44**, 550-1, 557-8.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL FoodNet surveillance report for 2004 (final report). [en ligne] (2004) Adresse URL : <http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2004/Report.pdf> Consulté le 10 juin 2007.
- CEBULA T.A., PAYNE W.I., FENG P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay- multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 248-250.
- CHAPMAN P.A., SIDDONS C.A., WRIGHT D.J., NORMAN P., FOX J., CRICK E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol. Infect.*, 1993, **111**, 439-447.
- CHAPMAN P.A., SIDDONS C.A., WRIGHT D.J., NORMAN P., FOX J., CRICK E. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs, and poultry. *Epidemiol. Infect.*, 1997, **119**, 245-250.
- CHARPENTIER X., OSWALD E. Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J. Bacteriol.*, 2004, **186**, 5486-5495.
- CHINA B., PIRSON V., MAINIL J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 3462-3465.
- CHINA B., PIRSON V., MAINIL J. Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium. *Vet. Microbiol.*, 1998, **63**, 249-259.
- CHINA B. Attaching and effacing *Escherichia coli*. *Rec. Res. Devel. Microbiol.*, 2000, **4**, 1-30.
- CHINA B., GHAFIR Y., DAUBE G. Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **147**, 99-109.
- CHINA B. La traçabilité génétique de la viande et des bactéries. *Bull. Soc. R. Sc. Liège*, 2002, **71**, 31-46.
- CLARK C.G., JOHNSON S.T., EASY R.H., CAMPBELL J.L., RODGERS F.G. PCR for detection of cdt-III and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 2671-2674.
- CLARKE R.C., WILSON J.B., READ S.C., RENWICK S., RAHN K., JOHNSON R.P., ALVES D., KARMALI M.A., LIOR H., Mc EWEN, SPIKA J., GYLES C.S. Verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) in the food chain : preharvest and processing perspectives. In: Karmali M.A., Gogio, A.G. (eds), Recent Advances in Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* Infections: Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on Verocytotoxin. Elsevier : Edinburgh, 1995, 17-24.
- CODEx ALIMENTARIUS COMMISSION Risk profile for the enterohemorrhagic *E. coli* including the identification of the commodities of concern, including sprouts, ground beef and pork. Thirty-fifth session, Orlando, USA, 27 January-1 february 2003.
- COWDEN J.M., AHMED S., DONAGHY M., RILEY A. The epidemiological investigation of the Central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December. *Epidemiol. Infect.*, 1997, **126**, 335-341.
- CREPIN V.F., SHAW R., ABE C.M., KNUTTON S., FRANKEL G. Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. *J. Bacteriol.*, 2005, **187**, 2881-2889.
- CRUMP J.A., SULKAA C., LANGER A.J., SCHABEN C., CRIELLY A.S., GAGE R., BAYSINGER M., MOL. M., WITHERS G., TONEY D.M., HUNTER S.B., HOEKSTRA R.M., WONG S. K., GRIFFIN P.M., VAN GILDER T.J. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N. Engl. J. Med.*, 2002, **347**, 555-560.
- CUNIN P., TEDJOUKAE., GERMANI Y., NCHARRE C., BERCION R., MORVAN J., MARTIN P.M. An epidemic of bloody diarrhea *Escherichia coli* O157 emerging in Cameroon. *Emerg. Infect.*

- Dis., 1999, **5**, 285-290.
- DAUBE G., WAUTERS W. O157 enterohemorrhagic *E. coli* in raw beef minced meat "Filet américain" in Belgium, 1998, Collection from participating members states of information on methodology and data to underpin a process for microbiological risk assessment at the European level (SCOOP).
- DE BOER E., HEUVELINK A.E. Methods for the detection and isolation of Shigatoxin-producing *Escherichia coli*. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*, 2000, **29**, 1335-1435.
- DEIBEL C., KRAMER S., CHAKRABORTY T., EBEL F. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine- phosphorylated 90kDa protein. *Mol. Microbiol.*, 1998, **28**, 463-474.
- DENG W., PUENTE J.L., GRUENHEID S., LI Y., VALLANCE B. A., VAZQUEZ A., BARBA J., IBARRA J. A., O'DONNELL P., METALNIKOV P., ASHMAN K., LEE S., GOOD D., PAWSON T., FINLAY B.B. Dissecting virulence : systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, **101**, 3597-3602
- DENG W., LI Y., VALLANCE B.A., FINLAY B.B. Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium* : sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 6323-6335.
- DE WOLF H., BLUST R., BACKELJAU T. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutat. Res.*, 2004, **566**, 249-262.
- DJORDJEVIC S.P., HORNITZKY M.A., BAILEY G., GILL P., VANSELOW B., WALKER K., BETTELHEIM K.A. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian slaughter-age sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 2017-2021.
- DONNENBERG M.S., DONOHUE-ROLFE A., KEUSCH G.T. Epithelial cell invasion : an overlooked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC adherence factor. *J. Infect. Dis.*, 1989, **160**, 452-459.
- DONOHUE-ROLFE A., KEUSCH G.T. *Shigella dysenteriae* 1 cytotoxin : periplasmic protein releasable by polymyxin B and osmotic shock. *Infect. Immun.*, 1983, **39**, 270-274.
- DUCOFFRE G. Surveillance des maladies infectieuses par un réseau de laboratoires de microbiologie 2001 : tendances épidémiologiques 1983-2000. [en ligne] (2003) Adresse URL : <http://www.iph.fgov.be/epidemio/epifr/plabfr/plabanfr/index01.htm>
- DUCOFFRE G. Surveillance des maladies infectieuses par un réseau de laboratoires de microbiologie, 2004 : tendances épidémiologiques 1983-2003. [en ligne] (2005) Adresse URL : <http://www.iph.fgov.be/epidemio/epifr/plabfr/plabanfr/index04.htm>.
- DUCOFFRE G. Surveillance des maladies infectieuses par un réseau de laboratoires de microbiologie 2005 : tendances épidémiologiques 1983-2004. [en ligne] (2007) Adresse URL : <http://www.iph.fgov.be/epidemio/epifr/plabfr/plabanfr/index05.htm>.
- DUFFY G., CUMMINS E., NALLY P., O'BRIEN S., BUTLER F. A review of quantitative microbiological risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Meat Sci.*, 2006, **74**, 76-88.
- EFFLER E., ISAACSON M., ARNTZEN L., HEENAN R., CANTER P., BARRETT T., LEE L., MAMBO C., LEVINE W., ZAIDI A., GRIFFIN P.M. Factors contributing to the emergence of *Escherichia coli* O157 in Africa. *Emerg. Infect. Dis.*, 2001, **7**, 812-819.
- EKLUND M., LEINO K., SIITONEN A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 4585-4593.
- ELLIOTT S.J., KREJANY E.O., MELLIES J.L., ROBINS-BROWNER M., SASAKAWA C., KAPER J.B. EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 4027-4033.
- EUROPEAN COMMISSION – HEALTH AND CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway in 2002. [en ligne] (2002) Adresse URL : http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/001_cover_2002.pdf
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway in 2004.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY Manual for Reporting on Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Food-borne Outbreaks in the framework of Directive 2003/99/EC, 2006, 88p.
- EUROPEAN UNION, COUNCIL Directive 92/117/EEC, 17 décembre 1992, concernant les mesures de protection contre certaines zoonoses et certaines agents zoonotiques chez les animaux et dans les produits d'origine animale, en vue de prévenir les foyers d'infection et d'intoxication dus à des denrées alimentaires. *Off. J. Eur. Union*, 1993, **L062**, 38-48.
- ESPIE E., HAEGHEBAERT S., BOUVET P., GRIMONT F., MARIANI P., VAILLANT V. Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France, 2002 et 2003. *Bull. Epidemiol. Hebd.*, 2004, **42**, 203-204.
- FACH P., PERELLES, DILASSER F., GROUT J. Comparison between a PCR-ELISA test and the Vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **90**, 809-818

- FACH P., PERELLE S., GROUT J., DILASSER F., Comparison of different PCR tests for detecting Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 and development of an ELISA-PCR assay for specific identification of the bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 2003, **55**, 383-392.
- FAGAN P.K., HORNITZKY M.A., BETTELHEIM K.A., DJORDJEVIC S.P. Detection of shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 868-872.
- FENG P., DEY M., ABE A., TAKEDA, T. Isogenic strain of *Escherichia coli* O157:H7 that has lost both Shiga toxin 1 and 2 genes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2001, **8**, 711-7177.
- FENG P., LAMPEL K A., KARCH H., WHITTAM T.S. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.*, 1998, **177**, 1750 -1753.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Application of Risk Analysis to Food Standards Issues. Report of the joint FAO/WHO expert consultation. Geneva, Switzerland 13-17 March 1995. WHO, Geneva.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Principes et directives régissant la conduite de l'évaluation des risques microbiologiques. [en ligne] (1999) Adresse URL : <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y1579F/y1579f05.htm> Consulté le 10 juin 2007.
- FORTIN N.Y., MULCHANDANI A., CHEN W. Use of real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal. Biochem.*, 2001, **289**, 281-288.
- FRATAMICO P.M., BAGI L.K., PEPE T. A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine feces. *J. Food Prot.*, 2000, **63**, 1032-1037.
- FRATAMICO P.M., SACKITEY S.K., WIEDMANN M., DENG M.Y. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 2188-2191.
- FRIEDRICH A.W., KOCK R., BIELASZEWSKA M., ZHANG W., KARCH H., MATHYS W. Distribution of the urease gene cluster among and urease activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 isolates from humans. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 546-550.
- FRIEDRICH A.W., BIELASZEWSKA M., ZHANG W.L., PULZ M., KUCZIUS T, AMMON A., KARCH H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants : frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.*, 2002, **185**, 74-84.
- GANNON V.P., D' SOUZA S., GRAHAM T., KING R.K., RAHN K., READ S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 656-662.
- GANNON V.P., TEERLING C., MASRI S.A., GYLES C.L. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* shiga-like toxin II family. *J. Gen. Microbiol.*, 1990, **136**, 1125-1135.
- GARBER L., WELLS S., SCHROEDER-TUCKER L., FERRIS K. Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms. *J. Food Prot.*, 1999, **62**, 307-312.
- GARMANDIA J., FRANKEL G., CREPIN V. Enteropathogenic an enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections : translocation, translocation, translocation. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 2573-2585.
- GERNER-SMIDT P., SCHEUTZ F. Standardized pulsed-field gel electrophoresis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* : the pulseNet Europe feasibility study. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2006, **3**, 74-80.
- GHOSH P. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2004, **68**, 771-795.
- GOFFAUX F., CHINA B., JANSSEN L., PIRSON V., MAINIL J. The locus for enterocyte effacement (LEE) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from dogs and cats. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1999, **473**, 129-136.
- GOFFAUX F., CHINA B., MAINIL J. Organisation and in vitro expression of *esp* genes of the LEE (locus of enterocyte effacement) of bovine enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.*, 2001, **83**, 275-286.
- GRIF K., DASCHNER F.D., BEUTIN L., CHEASTY T., SMITH H., ROWE B., DIERICH M.P., ALLERBERGER F. Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1998, **32**, 165-176.
- GRIFFIN P.M., TAUXE R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.*, 1991, **13**, 60-98
- GRIFFIN P.M., OLMSTEAD L.C., PETRAS R.E. *Escherichia coli* O157:H7 associated colitis: a clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology*, 1990, **99**, 142-149.
- GUNZER F., BOHM H., RUSSMAN H., BITZAN M., ALESKSIC S., KARCH H. Molecular detection of sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**, 1807-1810.
- HANCOCK D., BESSER T., LEJEUNE J., DAVIS M., RICE D. The control of VTEC in the animal reservoir. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, **21**, 66, 71-78.
- HE S.Y., NOMURA K., WHITTAM T.S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2004, **1694**, 181-206.
- HEUVELINK A.E., ZWARTKRUIS-NAHUIS J.T.M., VAN DE

- BIGGELAAR F.L.A.M., VAN LEEWEN W.J., DE BOER E. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **52**, 67-75.
- HEUVELINK A.E., VAN HEERWAARDEN C., ZWARTKRUIS-NAHUIS J.T., VAN OOSTEROM R., EDINK K., VAN DUYNHOVEN Y.T., DE BOER E. *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. *Epidemiol. Infect.*, 2002, **129**, 295-302.
- HUSSEIN H.S., BOLLINGER L.M. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J. Food Prot.*, 2005, **68**, 2224-2241.
- INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE Évaluation de la surveillance du syndrome hémolytique et urémique typique ou post-diarrhéique en France, 1996-2003. [en ligne] (2006) Adresse URL : http://www.invs.sante.fr/publications/2006/shu_1996_2003/shu_1996_2003.pdf Consulté le 8 avril 2007.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. *ISO 16654*, ISO, Suisse, 2001, 1-15.
- ITO H., TERA I A., KURAZONO H., TAKEDA Y., NISHIBUCHI M. Cloning and nucleotide sequencing of Vero toxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91: H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb. Pathog.*, 1990, **8**, 47-60.
- IZUMIYA H., TERAJIMA J., WADA A., INAGAKI Y., ITOH K.I., TAMURA K., WATANABE H. Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolate in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 1675-1680.
- JACKSON M.P., WADOLKOWSKI E.A., WEINSTEIN D.L., HOLMES R.K., O'BRIEN A.D. Functional analysis of the Shiga toxin and Shiga-like toxin type II variant binding subunits by using site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.*, 1990, **172**, 653-658.
- JERSE A.E., YU J., TALL B.D., KAPER J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990, **87**, 7839-7843.
- JOHNSON R.P., CLARKE R.C., WILSON J.B., READ S.C., RAHN K., RENWICK S.A. Growing concerns and recent outbreaks involving non O157:H7 serotypes of verocytotoxic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, 1996, **59**, 1112-1122.
- JONES I.G., ROWORTH M. An outbreak of *Escherichia coli* O157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. *Public Health*, 1996, **110**, 277-282.
- JONES S.W., DOBSIN M.E., FRANCESCONI S.C., SCHOSKE R., CRAWFORD R. DNA assays for detection, identification, and individualization of select agent microorganisms *Croat. Med. J.*, 2005, **46**, 522-529.
- JORES J., ZEHRKE K., EICHBERG J., RUMER L., WIELER L.H. Description of a novel intimin variant (type zeta) in the bovine O84:NM verotoxin-producing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of intimin typing. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2003, **228**, 370-376.
- KANACK K.J., CRAWFORD J.A., TATSUNO I., KARMALI M.A., KAPER J.B. SepZ/EspZ is secreted and translocated into HeLa cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 4327-4337.
- KARCH H., MEYER T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, **27**, 2751-2757.
- KARCH H., BOHM H., SCHMIDT H., GUNZER F., ALEKSIC S., HEESEMANN J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, **31**, 1200-1205.
- KARCH H., BIELASZEWSKA M., BITZAN M., SCHMIDT H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, **34**, 229-243.
- KARCH H., BIELASZEWSKA M. Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H- strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 2043-2049.
- KARMALI M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1989, **2**, 15-38.
- KENNY B., JEPSON M. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell. Microbiol.*, 2000, **2**, 579-590.
- KIMURA R., MANDRELL R.E., GALLAND J.C., HYATT D., RILEY L.W. Restriction-site-specific PCR as a rapid test to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 2513-2519.
- KOCH C., HERTWIG S., LURZ R., APPEL B., BEUTIN L. Isolation of a lysogenic bacteriophage carrying the stx1Ox3 gene which is closely associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from sheep and humans. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 3992-3998.
- KODAMA T., AKEDA Y., KONO G., TAKAHASHI A., IMURA, K., IIDA T. HONDA T. The EspB protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* interacts directly with alpha-catenin. *Cell. Microbiol.*, 2002, **4**, 213-222.
- KUMAR H.S., KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I., TEIZOU T., SHIMA K., YAMASAKI S. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from seafood and beef. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, **233**, 173-178.
- LEJEUNE J.T., BESSER T.E., HANCCOCK D.D. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Appl.*

- Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 3053-3057.
- LEUNG P.H., PEIRIS J.S., NG W.W., ROBINS-BROWNE R.M., BETTELHEIM K.A., YAM W.C. A newly discovered verotoxin variant VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 7549-7553.
- LEVINE M.M., XU J.G., KAPER J.B., LIOR H., PRADO V., TALL B., NATARO J., KARCH H., WACHSMUTH K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.*, 1987, **156**, 175-182.
- LIN Z., KURAZONO H., YAMASAKI S., TAKEDA Y. Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.*, 1993, **37**, 543-548.
- LUO Y., FREY E.A., PFUETZNER R.A., CREAGH A.L., KNOECHEL D.G., HAYNES C.A., FINLAY B.B., STRYNADKA N.C. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature*, 2000, **405**, 1073-1077.
- LEOMILL, PESTANA DE CASTRO A.F., KRAUSE G., SCHMIDT H., BEUTIN L. Characterization of two major groups of diarrheagenic *Escherichia coli* O26 strains which are globally spread in human patients and domestic animals of different species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, **249**, 335-342.
- MAINIL J., JACQUEMIN E.R., KAECKENBEEK A.E., POHL P.H., Association between the effacing (eae) gene and the Shiga-like toxin-encoding genes in *Escherichia coli* isolates from cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 1064-1068.
- MAINIL J. Shiga/Verocytotoxins and Shiga verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 235-257.
- MAINIL J. G., DAUBE G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **98**, 1332-1344.
- MARCHES O., LEDGER T.N., BOURY M., OHARA M., TU X., GOFFAUX F., MAINIL J., ROSENSHINE I., SUGAI M., DE RYCKE J., OSWALD E. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol. Microbiol.*, 2003, **50**, 1553-1567.
- MATSUZAWA T., KUWAE A., YOSHIDA S., SASAKAWA C., ABE A. Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1. *EMBO J.*, 2004, **23**, 3570-3782.
- MCDANIEL T.K., JARVIS K.G., DONNENBERG M.S., KAPER J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 1664-1668.
- MCNAMARA B.P., KOUTSOURIS A., O'CONNELL C.B., NOUGAYREDE J.P., DONNENBERG M.S., HECHT G. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J. Clin. Invest.*, 2001, **107**, 621-629.
- MEAD P.S., GRIFFIN P.M. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, 1998, **35**, 1207-1212.
- MENG J., ZHAO S., DOYLE M.P., MITCHELL S.E., KRESOVICH S. Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157:H. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, **32**, 103-113.
- MICHINO H., ARAKI K., MINAMI S., TAKAYA S., SAKAI N., MIYAZAKI M., ONO A., YANAGAAWA H. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in school children in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.*, 1999, **150**, 787-796.
- MONDAY S.R., WHITTAM T.S., FENG P.C. Genetic and evolutionary analysis of mutations in the *gusA* gene that cause the absence of beta-glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Infect. Dis.*, 2001, **184**, 918-921.
- MOON H.W., WHIPP S.C., ARGENZIORA A., LEVINEM.M., GIANNELLA R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.*, 1983, **41**, 1340-1351.
- MORABITO S., DELL'OMO G., AGRIMI U., SCHMIDT H., KARCH H., CHEASTY T., CAPRIOLI A. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Vet. Microbiol.*, 2001, **82**, 275-283.
- MORABITO S., TOZZOLI R., OSWALD E., CAPRIOLI A. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 3343-3348.
- MORGAN G.M., NEWMAN C., PALMER S.R., ALLEN J.B., SHEPHERD W., RAMPLING A.M., WARREN R.E., GROSS R.J., SCOTLAND S.M., SMITH H.R. First recognized community outbreak of haemorrhagic colitis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the UK. *Epidemiol. Infect.*, 1988, **101**, 83-91.
- MUZA - MOONS M.M., KOUTSOURIS A., HECHT G. Disruption of cell polarity by enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 7069-78.
- NATARO J.P., KAPER J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, **11**, 142-201.
- NAUTA M., EVERS E., TAKUMI K., HAVELAR A. Risk assessment of Shiga like producing *Escherichia coli* O157 in steak tartar in the Netherlands. *Report 257851003/*, 2001, (P69). Bilthoven, The Netherlands : RIVM
- NICHOLLS L., GRANT T.H., ROBINS-BROWN, R.M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of

- enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.*, 2000, **35**, 275-88.
- NOLLER A.C., McELLISTREM M.C., STINE O.C., MORRIS J.G.Jr., BOXRUD D.J., DIXON B., HARRISON L.H. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 675-679.
- OBERST R.D., HAYS M.P., BOHRA L.K., PHEBUS R.K., YAMASHIRO C.T., PASZKOKOLVA C., FLOOD S.J., SARGEANT J.M., GILLESPIE J.R. PCR-based DNA amplification and presumptive detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5' nuclease (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, **64**, 3389-3396.
- O'BRIEN A.D., LAVECK G.D., THOMPSON M.R., FORMAL S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 1982, **146**, 763-769.
- OGDEN I.D., HEPBURN N.F., MACRAE M. The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **91**, 373-379.
- OSTROFF S.M., KOBAYASHI J.M., LEWIS J.H. Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. *J. Am. Med. Assoc.*, 1989, **262**, 355-359.
- OSWALD E., SCHMIDT H., MORABITO S., KARCH H., MARCHES O., CAPRIOLI A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 64-71.
- PATON A.W., BOURNE A.J., MANNING P.A., PATON J.C. Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 2450-2458.
- PATON A.W., SRIMANOTE P., WOODROW M.C., PATON J.C. Characterization of saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 6999-7009.
- PATON A.W., RATCLIFF R.M., DOYLE R.M., SEYMOUR-MURRAY J., DAVOS D., LANSER J.A., PATON J.C. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 1622-1627.
- PERELLE S., DILASSER F., GROUT J., FACH P. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol. Cell. Probes*. 2004, **18**, 185-192.
- PERELLE S., DILASSER F., GROUT J., FACH P. Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **98**, 1162-1168.
- PIERARD D., MUYLDERMANNS G., MORIAU L., STEVENS D., LAUWERS S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 3317-3322.
- PIERARD D., HUYGHENS S., LAUWERS S., LIORH. Diarrhoea associated with *Escherichia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. *Lancet*, 1991, **338**, 762.
- PILIPCINEC E., TKACIKOVA L., NAAS H. T., CABADAJ R., MIKULA I. Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. *Folia Microbiol. (Praha)*, 1999, **44**, 455-456.
- POWELL M., EBEL E., SCHLOSSER W., WALDERHAUG M., KAUSE J. Dose response envelope for *Escherichia coli* O157:H7. *Quant. Microbiol.*, 2000, **2**, 141-163.
- PRADEL N., LEROY-SETRIN S., JOLY B., LIVRELLI V. Genomic subtraction to identify and characterize sequences of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 2316-2325.
- PRUIMBOOM-BREES I.M., MORGAN T.W., ACKERMANN M.R., NYSTROM E.D., SAMUEL J.E., CORNICK N.A., MOON H.W. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2000, **97**, 10325-10329.
- RADU S., RUSUL G., LING O.W., PURWATI E., MUSTAKIM M., LIHAN S. Rapid isolation and detection of *Escherichia coli* O157:H7 by use of rainbow agar O157 and PCR assay. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 2000, **31**, 77-79.
- RAMACHANDRAN V., HORNITZKY M.A., BETTELHEIM K.A., WALKER M.J., DJORDJEVIC S.P. The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 1932-1937.
- RANDALL L.P., WRAY C., MCLAREN I.M. Studies on the development and use of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of verotoxic *Escherichia coli* in animal faeces. *Vet. Rec.*, 1997, **140**, 112-115.
- RANGEL J.M., SPARLING P.H., CROWE C., GRIFFIN P.M., SWERDLOW D.L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks United States, 1982-2002. *Emerg. Inf. Dis.*, 2005, **11**, 603-609.
- RICHARDSON S.E., KARMAI M.A., BECKER L.E., SMITH C.R. The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Hum. Pathol.*, 1988, **19**, 1102-1108.
- ROBERTS C.L., MSHAR P.A., CARTTER M.L., HADLER

- J.L., SOSIN D.M., HAYES P.S., BARRETT T.J. The role of heightened surveillance in an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol. Infect.*, 1995, **115**, 447-454.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, **239**, 487-491.
- SAVKOVIC S.D., RAMASWAMY A., KOUTSOURIS A., HECHT G. EPEC-activated ERK1/2 participate in inflammatory response but not tight junction barrier disruption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2001, **281**, G 890-898.
- SCHMIDT H., BEUTIN L., KARCH H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 1055-1061.
- SCOTLAND S.M., SMITH H.R., WILLSHAW G.A., ROWE B. Vero cytotoxin production in strain of *Escherichia coli* is determined by genes carried on bacteriophage. *Lancet*, 1983, **2**, 216.
- SCOTLAND S.M., ROWE B., SMITH H.R., WILLSHAW G.A., GROSS R.J. Verocytotoxin producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes. *J. Med. Microbiol.*, 1988, **25**, 237-243.
- SHARMA V.K., DEAN-NYSTROM E.A., CASEY T.A. Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxinogenic *E. coli*. *Mol. Cell. Probes*, 1999, **13**, 291-302.
- SHARMA V.K., DEAN-NYSTROM E.A. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins. *Vet. Microbiol.*, 2003, **93**, 247-260.
- SHARMA V.K. Detection and quantitation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O111, and O26 in beef and bovine feces by real-time polymerase chain reaction. *J. Food. Prot.*, 2002, **65**, 1371-1380.
- SHEHIB Z.A., ABDUL GHANI Z.G., MAHDI L.K.H. First report of *Escherichia coli* O157 among Iraq children. *East. Mediterr. Health J.*, 2003, **9**, 1-7.
- SINCLAIR J.F., O'BRIEN A.D. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 2876-2885.
- SMITH D., WILLSHAW G., STANLEY J., ARNOLD C. Genotyping of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: comparison of isolated of a prevalent phage type by fluorescent amplified-fragment length polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, **38**, 4616-4620.
- STROCKBINE N.A., MARQUES L.R., NEWLAND J.W., SMITH H.W., HOLMES R.K., O'BRIEN A.D. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.*, 1986, **53**, 135-140.
- TAMPAKAKI A. P., FADOULOGLOU V.E., GAZI A.D., PANOPOULOS N.J., KOKINIDIS M. Conserved features of type III secretion. *Cell. Microbiol.*, 2004, **6**, 805-816.
- TARR C.L., WHITTAM T.S. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *J. Bact.*, 2002, **184**, 479-489.
- TARR C.L., LARGET M., MOELLER C.L., LACHER D.W., TARR P.I., ACHESON D.W., WHITTAM T.S. Molecular characterization of a serotype O121:H19 clone, a distinct Shiga toxin-producing clone of pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 6853-6859.
- TARR P.I., BILGE J.C., VARY JR J.C., JELACIC S., HABEED R.L., WARD T.R., BAYLO M.R., BESSER T.E. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 1400-1407.
- TORRES A.G., GIRON J.A., PERNA N.T., BURLAND V., BLATTNER F.R., AVELINO-FLORES F., KAPER J.B. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 5416-27.
- TYLER S.D., JOHNSON W.M., LIOR H., WANG G., ROZEE K.R. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 1339-1343.
- URWIN R., MAIDEN M.C.J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.*, 2003, **11**, 479-487.
- VAILLANT V., ESPIÉ E. Facteurs de risque de survenue des syndromes hémolytiques et urémiques liés à une infection à *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines chez les enfants âgés de moins de 15 ans : étude cas-témoins 2000-2001. Institut de Veille Sanitaire : Saint Maurice, 2003, 61 p.
- VAN AMERONGEN A., KOETS M. Simple and rapid bacterial protein and DNA diagnostic methods based on signal generation with colloidal carbon particles. In : Van Amerongen A, Barug D., Lauwaars M.(Eds), Rapid Methods: For Biological And Chemical Contaminants In Food And Feed. Wageningen, 2005.
- VERNOZY-ROZAND C. Les *Escherichia coli* vérotoxiques (VTEC) et *Escherichia coli* O157:H7 en clinique et en agro-alimentaire. *Ann. Biol. Clin.*, 1999, **57**, 507-516.
- VERNOZY-ROZAND C., MONTET M.P., LEQUERREC F., SERILLON E., TILLY B., BAVAI C., RAY-GUENIOT S., BOUVET J., MAZUY-CRUCHAUDET C., RICHARD Y. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, **93**, 473-478.
- VIMONT A., VERNZOY-ROZAND C., MONTET M.P., LAZIZZERA

- C., BAVAI C., DELIGNETTE-MULLER M.L. Modeling and predicting the simultaneous growth of *Escherichia coli* O157:H7 and ground beef background microflora for various enrichment protocols. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, **72**, 261-268.
- VISWANATHAN V.K., KOUTSOURIS A., LUKIC S., PILKINTON M., SIMONOVIC I., SIMONOVIC M., HECHT G. Comparative analysis of EspF from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in alteration of epithelial barrier function. *Infect. Immun.*, 2004, **72**, 3218-3227.
- WANG G., CLARK C.G., RODGERS F.G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 3613-3619.
- WANG G., ZHAO T., DOYLE M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 2567-2570.
- WEAGANT S.D., BOUND A.J. Evaluation of techniques for enrichment and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially contaminated sprouts. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, **71**, 87-92.
- WEINSTEIN D.L., JACKSON M.P., SAMUEL J.E., HOLMES R.K., O'BRIEN A. Cloning and sequencing of a shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strains responsible for edema disease of swine, *J. Bacteriol.*, 1988, **170**, 4223-4230.
- WENTWORTH B.B. Bacteriophage typing of the Staphylococci. *Bacteriol. Rev.*, 1963, **27**, 253-272.
- WHIPP S.C., RASMUSSEN M.A., CRAY W.C.J.R. Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1994, **204**, 1168-1175.
- WILSON J.B., CLARKE R.C., RENWICK S.A., RAHN K., JOHNSON R.P., KARMALI M.A., LIOR H., ALVES D., GYLES C.L., SANDHU K.S., MC.EWEN S.A., SPIKA J.S. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J. Infect. Dis.*, 1996, **174**, 1021-1027.
- YOSHITOMI K.J., JINNEMAN K.C., WEAGANT S.D. Detection of Shiga toxin genes *stx1*, *stx2*, and the +93 *uidA* mutation of *E. coli* O157:H7/H-using SYBR Green I in a real-time multiplex PCR. *Mol. Cell. Probes*, 2006, **20**, 31-41.
- ZADIK P.M., CHAPMAN P.A., SIDDONS C.A. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *E. coli* O157. *J. Med. Microbiol.*, 1993, **39**, 155-158
- ZHANG W., BIELASZEWSKA M., KUCZIUS T., KARCH H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx* (1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from human. *J. Clin. Microbiol.*, 2002a, **40**, 1441-1446.
- ZHANG W. L., KOHLER B., OSWALD E., BEUTIN L., KARCH H., MORABITO S., CAPRIOLI A., SUERBAUM S., SCHMIDT H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 2002b, **40**, 4486-4492.